

Massenspektrometrische Untersuchungen an Oligonukleotiden

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M. Sc. Stefanie Ickert

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen:

1. Prof. Michael W. Linscheid
2. PD Michael Weller
3. Prof. Ilko Bald

Tag der mündlichen Prüfung: 13.09.2018

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Nutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Berlin, den 25.06.2018

Stefanie Ickert

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael W. Linscheid für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die großartige und inzwischen langjährige Zusammenarbeit. Über ein Praktikum, die Bachelor- und Masterarbeit bis hin zur Promotion hat er mir immer wieder die Möglichkeit gegeben, spannende Themen zu bearbeiten und mich weiterzuentwickeln. Insbesondere während der Promotionszeit war es eine für mich perfekte Mischung aus Freiräumen, aber auch immer der Möglichkeit von sehr guten fachlichen Diskussionen und persönlicher Unterstützung. In seinem Arbeitskreis habe ich immer sehr gerne gearbeitet und werde diese Zeit in sehr guter Erinnerung behalten.

Prof. Dr. Ulrich Panne danke ich vielmals für die Unterstützung und die Möglichkeit, dieses herausfordernde Thema zu bearbeiten. Außerdem möchte ich mich für die zahlreichen Weiterbildungsmöglichkeiten an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung bedanken.

Ich danke PD Dr. Michael G. Weller sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie Prof. Dr. Ilko Bald für das Drittgutachten und die interessanten fachlichen Diskussionen, sowie für die Bereitstellung diverser Oligonukleotide.

Des Weiteren möchte ich mich beim ganzen Arbeitskreis Angewandte Analytik und Umweltchemie der Humboldt-Universität zu Berlin, sowie beim Fachbereich Optische und Chemische Sensorik der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung bedanken. Dabei sind besonders Dr. Jens Riedel und Dr. Sebastian Beck hervorzuheben, deren persönliche und fachliche Unterstützung von unschätzbarem Wert für mich war. Meinen wunderbaren Kollegen, insbesondere Dr. Gunnar Schwarz, Dr. Lena Ruhe, Dr. Sabrina Trog, Dr. David Benda, René Becker, Axel Bolz, Tobias Gerhardt und Sebastian van Wasen, die mittlerweile auch sehr gute Freunde sind, möchte ich von Herzen für die super Atmosphäre und die vielen nicht immer fachlichen Diskussionen danken.

Timm Schwaar möchte ich ganz besonders für die Programmierung eines Fragmentkalkulationsprogrammes danken. Es hat mir Wochen und Wochen manueller Arbeit erspart.

Mein Dank gilt außerdem Christoph Naese für die schnelle und kompetente Umsetzung meiner immer neuen Bastelvorschläge für die MS/MS Quelle und seine unerschütterliche Geduld.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Auszubildenden Yasmis Kutz, meinem Bachelorstudenten Timur Nowak und meinem Praktikanten Konstantinos Papadakis für die gute Arbeit bedanken.

Ich danke Dr. Johanna Hofmann und Márkó Grabarics, sowie Prof. Dr. Kevin Pagel, vom Fritz-Haber-Institut, für die IMS Messungen und die gute fachliche Zusammenarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Kathrin Textoris-Taube und Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel dafür, dass ich ihr Massenspektrometer an der Charité nutzen durfte.

Dr. Andreas Springer danke ich vielmals für die Messungen am Synapt an der Freien Universität.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich von ganzem Herzen für die immerwährende Unterstützung und vor allem für das jahrelange freundliche Nicken wenn ich wieder und wieder stundenlang über meiner Arbeit monologisiert habe.

Zusammenfassung

Die Massenspektrometrie stellt heutzutage eine der bedeutendsten Techniken in der analytischen Chemie dar. Besonders in der Bioanalytik hilft der technische Fortschritt in der Instrument- und Geräteentwicklung bei der Beantwortung von komplexen Fragestellungen. Bislang können, nicht zuletzt aufgrund der unzähligen unterschiedlichen Analyten, die sich in ihrer Stabilität und ihrem chemischen Verhalten drastisch unterscheiden, nicht alle Prozesse erklärt werden. Eine systematische Untersuchung instrumenteller Möglichkeiten bedarf daher immer eines geeigneten Modellsystems. Um dazu einen Beitrag zu leisten, wurden in dieser Arbeit DNA-Oligonukleotide untersucht. DNA stellt eine sehr vielseitige Probe dar, mit deren Hilfe sowohl kovalente, als auch nicht-kovalente Bindungsbrüche in hohen Ladungszuständen untersucht werden können. Oligonukleotide sind darüber hinaus sehr stabil, so dass insgesamt gezielt verschiedene Fragmentierungsstrategien umfassend geprüft werden konnten. Zu diesem Zweck wurden Einzel- und Doppelstränge verschiedener Längen und Sequenzen auf ihr Verhalten in der Gasphase untersucht. Die einzelnen DNA-Bausteile wie Nukleobasen, Nukleotide und deren Oligomere weisen eine besonders hohe Fragmentierungsenergie sowie ein spezifisches Zerfallsverhalten auf. Aufgrund dieser Eigenschaften stellt DNA ein hervorragendes Modellsystem dar.

Mit Hilfe von Tandem-MS(MS/MS)-Experimenten in Kombination mit der Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) wurde die räumliche Ausdehnung und die benötigte Fragmentierungsenergie von Einzelstrang-DNA, unter Berücksichtigung des Ladungslevels, also der Ladung pro Phosphateinheit und der Sequenz analysiert. Die Ionenmobilität hängt von der geometrischen Anordnung der Molekülionen ab, so dass strukturelle Veränderungen der Ionen detektiert werden können. Dadurch konnte ein sequenzunabhängiger Fragmentierungspunkt ermittelt werden, welcher ausschließlich vom Ladungszustand bestimmt wurde. Es zeigte sich ein linearer Anstieg der benötigten Energie bei zunehmender Ladung, wobei bei mittleren Ladungszuständen ein Sattelpunkt erreicht wurde. Durch IMS konnte dieser Bereich als geometrische Umfaltungszone bestätigt werden. Zum Vergleich wurden einzelsträngige *Locked Nucleic Acids* (LNAs) gleicher Sequenz analysiert. Diese zeigten durch ihre starre Struktur ein anderes Fragmentierungs- und Auffaltungsverhalten. Es wurde für die Dissoziation mehr Energie benötigt, ohne dass sich eine Energieumverteilung durch strukturelle Umfaltung in Form eines Sattelpunktes zeigte.

Des Weiteren konnten beim Vergleich von verschiedenen kollisionsbasierten Fragmentierungstechniken Unterschiede mit einzelsträngiger DNA gezeigt werden, die mit anderen Stoffklassen nicht festgestellt wurden. Somit kann DNA als empfindlicher Sensor für geringfügige Unterschiede in der Fragmentierungstechnik, gerade bei solchen, die auf einem ähnlichen Prinzip beruhen, dienen. Weiterhin wurden Doppelstränge verschiedenster Sequenzen, inklusive bewusst eingebrachter Fehlpaarungen und -stellen mittels kollisionsinduzierter Dissoziation bezüglich ihrer Zerfallswege untersucht und verglichen.

Nachdem verschiedene etablierte MS/MS-Techniken angewendet wurden, und die Ergebnisse sowohl in Bezug auf die spezifischen Fragmentierungsmechanismen als auch auf das Zerfallsverhalten von DNA-Bausteinen untersucht wurden, konnte abschließend eine neue vakuumultraviolette-Strahlungs(VUV)-basierte MS/MS-Methode entwickelt werden. Zu diesem Zweck wurde eine kommerziell erhältliche Deuteriumlampe, welche hochenergetische Photonen mit einer Wellenlänge von bis zu ≥ 115 nm abstrahlt, in ein lineares Ionenfallen-MS verbaut. Die Strahlung wurde in das Zentrum der Ionenfalle fokussiert. Bei der Bestrahlung verschiedener Probenklassen, wie Oligonukleotiden, Peptiden oder Kohlenhydraten, konnten unterschiedliche Phänomene, wie eine für kollisionsbasierte MS/MS Methoden untypische Fragmentierung, beobachtet werden. Bei höher geladenen Ionen konnte eine Ladungsreduktion durch das Herausschlagen von Elektronen erreicht werden, so dass ganze Ladungsserien erzeugt werden konnten. Außerdem konnten bei Proben, wie z.B. Adenosintriphosphat, neue Fragmentationen generiert werden.

In dieser Arbeit wurden Oligonukleotide mittels Ionenmobilität bezüglich ihrer räumlichen Struktur, verschiedener Tandem-MS-Techniken und hochenergetische VUV-Strahlungen bezüglich ihrer Dissoziationspfade untersucht, um somit neue Erkenntnisse über das Gasphasen- und Dissoziationsverhalten von großen Molekülonen zu gewinnen.

Abstract

Mass spectrometry represents one of the most important techniques in analytical chemistry today. Especially in bioanalysis, complex questions can be answered with the help of more and more advanced instruments. So far, however, despite extensive use, not all processes in the mass spectrometer can be fully explained. This is not only due to the high number of different potential analytes, which differ drastically in their stability and chemistry. A systematic investigation of instrumental possibilities therefore always requires a suitable model system. In order to contribute to this, DNA-oligonucleotides were investigated in this work. DNA plays a unique role as an inheritor of life. DNA is a very versatile sample in MS that can be used to study both covalent and noncovalent bond breaking in high charge states. Oligonucleotides are also very stable, so that targeted fragmentation strategies can be tested. For this purpose, single and double strands of different lengths and sequences were investigated for their behavior in the gas phase. Thus, DNA differs from other biomolecules, which usually follow simple disintegration pathways in tandem MS experiments.

Ion mobility was used to examine the spatial extent of single-stranded DNA in terms of its charge level and sequence in combination with a MS to determine the required fragmentation energies. The mobility of the ions depends on the geometric size of the molecular ions. Thus, structural changes of the ions can be detected. A sequence-independent fragmentation point could be found, which was determined exclusively by the charge level. It showed a linear increase in the required energy with increasing charge, with a saddle point was present at intermediate charge states. By ion mobility spectrometry this area could be confirmed as a geometric refolding zone. For comparison, single-stranded Locked Nucleic Acids (LNAs) of the same sequence were also analysed. Due to their rather rigid structure, these showed a considerably different fragmentation and also unfolding behavior. Significantly more energy was needed for the dissociation without any redistribution of energy due to structural refolding in the form of a saddle point. Instead, the trend was linear.

Subsequently, the product ions from different collision-based fragmentation techniques were compared, and it was found that single-stranded DNA, as opposed to other classes, showed large differences between the methods due to the complex and versatile dissociation channels. Therefore, it could serve as a sensitive sensor for minor differences in fragmentation technique. Furthermore, double strands of different sequences, including artificially introduced mismatches and defects, were investigated by means of collision-induced dissociation with

respect to their fragmentation pathways. Specific fragmentation patterns could be identified, which could be assigned to clear trends in terms of neutral base loss, simple strand breaks, and the formation of single strands and their fragments. In contrast, hybrid duplexes of LNA and DNA again confirmed the significantly higher stability of DNA analogues, with a significantly reduced tendency for dissociation compared to DNA. After various established tandem MS techniques were used, and the results both in terms of specific fragmentation mechanisms, a new VUV (vacuum ultraviolet radiation) -based MS/MS method was developed and tested for DNA in particular, as well as for the fragmentation behavior of DNA building blocks. For this purpose, a commercially available deuterium lamp that has a short wavelength (high-energy emission spectrum with photons of up to ≥ 115 nm), was installed in a linear ion trap MS. With higher charged ions, a charge reduction could be achieved by the ejection of electrons. Subsequently, the already known dissociation pathways could be observed, for example in DNA. In addition, new product ions could also be generated for other samples, such as adenosine triphosphate.

In summary, oligonucleotides were investigated by means of ion mobility with regard to their spatial structure, various tandem MS techniques with respect to their dissociation pathways and high-energy VUV radiation in order to gain new insights into the gas-phase and dissociation behavior of large ions

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	V
Abstract.....	VII
Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung.....	3
1.1. Tandem-MS.....	4
1.1.1. Quasi-Gleichgewichtstheorie.....	5
1.1.2. Kollisionsinduzierte Dissoziation.....	5
1.1.3. Strahlungsinduzierte Dissoziation	9
1.2. Ionenmobilitätsspektrometrie.....	11
1.3. DNA – Komplexität als analytische Herausforderung und Chance.....	14
1.4. <i>Locked Nucleic Acids</i>	16
2. Schlussfolgerungen für die aktuelle Arbeit und Zielstellung.....	18
3. Ergebnisse & Diskussion	20
3.1. Allgemeines Gasphasenverhalten von DNA.....	21
3.1.1. Ladungsgetriebene geometrische Reorganisation von Einzelsträngen.....	21
3.1.2. Ladungsabhängiges Verhalten von LNA-Strängen	27
3.2. Kollisionsinduzierte Dissoziation von Einzel- und Doppelsträngen.....	31
3.2.1. 4-mere im Vergleich zwischen CID und HCD	31
3.2.2. CID Experimente an Doppelstrang-DNA.....	38
3.2.3. CID Experimente an Einzel- und Doppelstrang LNA	46
3.3. Vakuum-ultraviolette Strahlung als neue MS/MS Methode	54
3.3.1. Instrumentierung	54
3.3.2. VUV MS/MS in der Anwendung	60
4. Ausblick	71
5. Abkürzungsverzeichnis.....	73
6. Experimenteller Teil	74
6.1. Chemikalienliste.....	74
6.2. Tandem-MS-Messungen	74
6.2.1. Oligonukleotide und andere Proben.....	74
6.2.2. LTQ.....	75

6.2.3.	Synapt	75
6.2.4.	Orbitrap	75
6.3.	IM-MS Messungen.....	76
6.4.	<i>High Brightness</i> VUV Lichteinheit.....	76
7.	Anhang.....	78
8.	Literaturverzeichnis	89

1. Einleitung

Aufgrund der breiten Anwendungsmöglichkeiten sind in der instrumentellen Analytik heutzutage massenspektrometrische Methoden weit verbreitet, wodurch die Massenspektrometrie (MS) eine besondere Stellung innerhalb der analytischen Chemie innehat. Die MS basiert grundsätzlich auf einer Trennung von verschiedenen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z). Zu diesem Zweck, werden zunächst geladene Teilchen in einer Ionenquelle erzeugt, welche dann in einem Analysator aufgetrennt werden, um anschließend mit einem Detektor erfasst zu werden. Die vielfältigen Möglichkeiten, die MS bietet, unterscheiden sich dabei stark im experimentellen Aufwand, der Messgenauigkeit, sowie deren Einsatzgebiet. Exemplarisch für die Bedeutung der MS können die Publikationen aller unter der Nature Publishing Group (NPG) zusammengefasster Zeitschriften herangezogen werden. Obwohl diese Zeitschriften alle Naturwissenschaften umfassend beinhalten, stieg der Anteil an Publikationen mit MS als Schlagwort hier von knapp 0,6 % um 1970-1979 bis auf rund 6 % in den letzten neun Jahren.(1) Insbesondere die Entwicklung schonender Ionisierungstechniken unter Atmosphärendruck in den 90er Jahren ließ diese Anzahl aufgrund der neuen Möglichkeiten in der Bioanalytik stark ansteigen. Mittels Elektrosprayionisation (ESI)-MS und Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisation (MALDI)-MS konnten nun auch große Biomoleküle wie Proteine oder Desoxyribonukleinsäure (DNA) nahezu fragmentierungsfrei ionisiert und in die Gasphase gebracht werden.(2, 3) Des Weiteren liegt ein großer Vorteil der MS in der Möglichkeit der Kopplung von Systemen wie Chromatographieranlagen, Elektrophorese oder einer Ionenmobilitätsspektrometrie zur vorherigen Auftrennung komplexer Gemische, wie biologischen Proben. Tandem-MS(MS/MS)-Techniken ermöglichen außerdem Strukturaufklärung, beispielsweise der Aminosäuresequenz von Peptiden oder Proteinen. Aus all diesen Möglichkeiten entwickelten sich vielfältige MS-basierte bioanalytische Untersuchungsmethoden. Durch die immer weiter verbreitete Anwendung von MS wird auch die Notwendigkeit größer, die Prozesse von der Ionenbildung bis zur Fragmentierung im Detail zu verstehen, um Methoden weiterentwickeln zu können. Dazu beschäftigt sich diese Arbeit mit einer detaillierten Untersuchung unterschiedlicher etablierter Fragmentierungstechniken, sowie der Einführung einer neuen vakuumultravioletten Strahlungs(VUV)-basierten MS/MS-Methode.

1.1. Tandem-MS

Während einfache massenspektrometrische Messungen nur die Ermittlung eines m/z -Verhältnisses erlauben, können Tandem-MS-Experimente, auch MS/MS oder MS^2 genannt, einen tieferen Blick in die Struktur von großen Ionen ermöglichen. Um ein Tandem-MS-Experiment durchzuführen, wird aus dem Spektrum des Totalionenstromes gezielt eine m/z -Fraktion mit einer zentralen nominellen Masse m und einer Isolationsbreite Δm isoliert (Vorläuferion). Dabei ist insbesondere auf die Isolationsbreite zu achten, da es sich nicht um eine rechteckige Isolierung handelt. Das bedeutet, dass bei einer zu engen Isolationsbreite die benachbarten Isotopensignale, welche bei komplexen Spektren wichtig für die Zuordnung der Signale zu Analyten oder deren Strukturelementen sein können, oft nicht miterfasst werden. Bei einer zu breiten Isolation wiederum besteht die Möglichkeit, dass interferierende Ionen, welche nicht zum Zielion gehören, miterfasst werden. Anschließend, nach der Isolierung, wird den isolierten Ionen Energie zugeführt, um diese zur Spaltung von Bindungen anzuregen, also zu fragmentieren. Je nach verwendetem MS-Typ kann dieser Schritt anschließend auch mit den gebildeten Fragmentionen wiederholt werden (MS^n -Experimente). (Abbildung 1) (4-8)

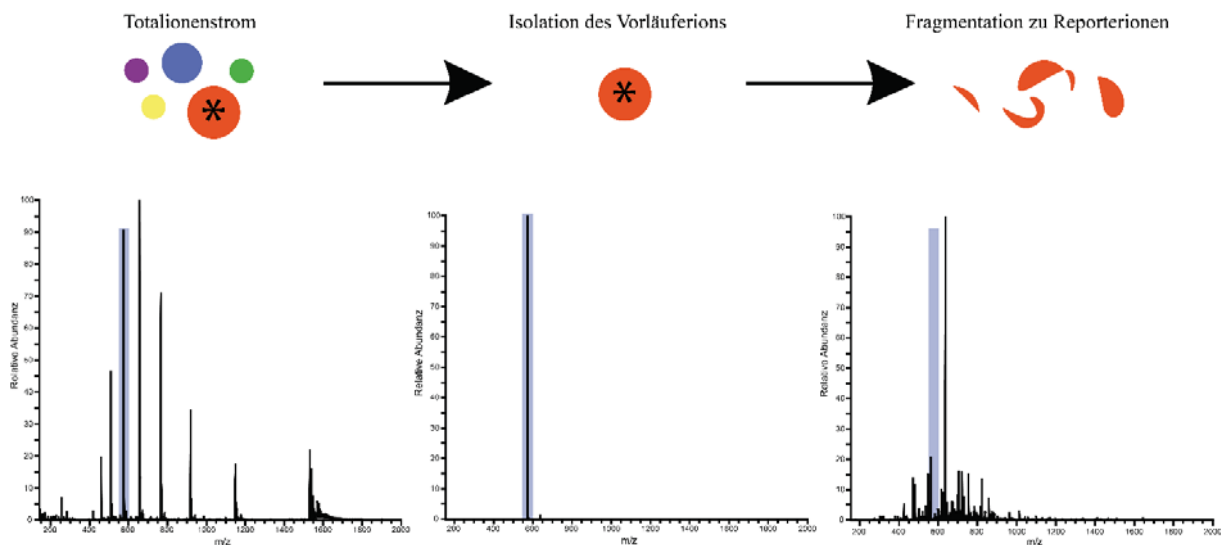


Abbildung 1. Teilschritte eines MS/MS-Experimentes. Zunächst wird ein Totalionenstrom detektiert (links) und anschließend ein Signal isoliert (mitte). Dieses wird durch Energiezufuhr fragmentiert und liefert ein Fragmentionenspektrum (rechts). Abbildung geändert nach (9).

Der Energieeintrag für die Fragmentierung kann auf verschiedene Weise erfolgen. Herkömmliche Methoden verwenden dabei zumeist eine Anregung durch Strahlung oder Stöße mit einem neutralen Gas. In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich die stoßinduzierte Fragmentierung genutzt, daher soll diese näher erläutert werden.(10-13)

1.1.1. Quasi-Gleichgewichtstheorie

Zum besseren Verständnis von MS/MS-Techniken, den resultierenden Spektren und Abläufen dient die Quasi-Gleichgewichtstheorie (QET). Diese wurde speziell für die Bedingungen in einem MS entwickelt und an diese angepasst.(14) Sie beschreibt den unimolekularen Zerfall, also eine Reaktion nur eines Moleküls, hochangeregter Ionen im Hochvakuum. Die Ionen sind im MS isoliert und können nicht mit anderen Spezies wechselwirken. Somit stehen sie nicht im thermischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung und können ihre Energie nur intern umverteilen.(15) Dadurch sind nur unimolekulare Reaktionen wie Isomerisierung und Dissoziation möglich.(14, 16-18) Die QET beschreibt nun die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation von isolierten Ionen als eine Funktion der inneren Energie und der Mindestenergie für den Zerfall des Ions, also der Aktivierungsenergie der Reaktion. Diese Energie kann z. B. durch Stöße zugeführt werden. Dabei sind die Konstanten makroskopisch und rein statistisch und haben keine Abhängigkeit von der Konzentration, wie bei Reaktionen höherer Ordnung. Man spricht von einer Reaktion nullter Ordnung. Bei MS/MS-Experimenten sind viele Fragmentierungswege zu beachten, welche nicht alle die gleiche Geschwindigkeitskonstante haben. Die zugeführte Energie in solchen Versuchen wird dabei auf alle Schwingungsfreiheitsgrade verteilt.(15) Das bedeutet, dass das Ion zwar umso schneller zerfällt, je höher seine Energie ist, aber auch, dass es umso langsamer dissoziiert, je mehr Schwingungsfreiheitsgrade vorhanden sind, über welche sich die Energie verteilen kann. Große Ionen mit vielen Schwingungsfreiheitsgraden zerfallen also langsamer als kleine Ionen. Die Geschwindigkeit der Dissoziation ist dabei kleiner, als die der Verteilung. Es stellt sich ein Quasi-Gleichgewicht der Verteilung der Ionen im aktivierten Zustand und denen im Ausgangszustand ein, welches statistisch beschrieben werden kann. Das Intensitätsverhältnis von massenspektrometrischen Fragmenten hängt dabei sowohl von der Energieverteilung im Primärion als auch von den Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziationen ab. So konnte die QET erfolgreich zur theoretischen Kalkulation von relativen Signalintensitäten von Ionen und deren Fragmenten angewendet werden.(14, 15, 19-22)

1.1.2. Kollisionsinduzierte Dissoziation

Die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) stellt eine der einfachsten und weit verbreitesten Methoden zur Fragmentierung von großen Ionen in der MS dar.(23, 24) Eine Vielzahl von Untersuchungen können so beispielsweise im Bereich der Bioanalytik mit ihrer Hilfe durchgeführt werden. Gerade die rasante Entwicklung der Ionenfallentechnik in den letzten

Jahrzehnten ermöglicht heute Routineanalysen von äußerst komplexen biologischen Fragestellungen, wie der Zusammensetzung von Zelllysaten, sowie der Quantifizierung von Proteinen. Von einfachen Paulfallen über lineare Ionenfallen bis zu hochauflösenden Systemen wie der Ionenzyklotronresonanzfalle (ICR) und der Orbitrap sind all diese Techniken in der Lage MS/MS-Experimente durchzuführen. Die CID Fragmentierung kann bei ICR-Fallen und Orbitraps vorher durchgeführt werden, wobei anschließend die Fragmentionen weitergeleitet und hochaufgelöst analysiert werden können. Die Ionen werden dabei im MS mit einem neutralen Stoßgas (He, N₂, Ar) zur Kollision gebracht.⁽¹⁰⁾ In einer Ionenfalle werden die Kollisionen durch Anlegen einer RF-Spannung an die Endkappen der Falle eingeleitet.⁽²⁵⁾ Die Frequenz dieses Wechselstrompotentials wird typischerweise so ausgewählt, dass sie in Resonanz mit der Frequenz des isolierten Fragments ist. Infolgedessen ist die Anregung in Bezug auf den m/z -Wert der Ionen in der Falle resonant und Energie wird nur auf das ausgewählte Ion übertragen.⁽²⁶⁾ Das Gas kollidiert mit den Ionen, wobei ein zweistufiger Prozess abläuft. Zunächst wird eine aktivierte Spezies gebildet. Die zugeführte Energie wird dann als Schwingungsenergie auf alle Bindungen verteilt, bis die zur Dissoziation benötigte Energie erreicht ist und das Molekülion dissoziiert. Es laufen alle Fragmentierungswege, die bei dieser Energie möglich sind, ab. Während jeder dieser Kollisionen bestimmt die relative Geschwindigkeit, sowie die reduzierte Masse die Höhe der Kollisionsenergie, während das Massenverhältnis der Kollisionsgase und interne Freiheitsgrade die Menge der übertragenen Energie bestimmen.^(23, 27-31) Die innere Energie zu diesem Zeitpunkt setzt sich zusammen aus der inneren Energie vor dem Stoß und der während des Stoßes übertragenen Energie. Diese Zusammenhänge sind als unmittelbare Konsequenzen der Energie- und Impulserhaltung makroskopische, skalare Größen. Auf mikroskopischer Ebene hängt die Anregung der individuellen Schwingungsfreiheitsgrade von deren Orientierung und dem relativen Stoßwinkel ab. Der Stoßwinkel kann dabei sehr verschieden sein, wodurch die übertragene Energie eine breite Verteilung ausweist.

Wegen des enormen Potenzials der CID für die strukturelle Identifizierung und Charakterisierung organischer Moleküle und des universell möglichen Einsatzes ist diese Technik nicht nur weit verbreitet, sondern auch weiterentwickelt worden. Kollisionsexperimente sind in der Vielzahl unterschiedlichster Gerätetypen verfügbar. Zusätzlich wurde in Orbitrap-Geräten ein neues System, die *Higher Energy Collision Dissociation* (HCD), etabliert. In der Orbitrap kann nun die CID in der linearen Ionenfalle und die HCD in einem Oktopol hinter oder in der C-Trap stattfinden. (Abbildung 2) (11, 12, 32)

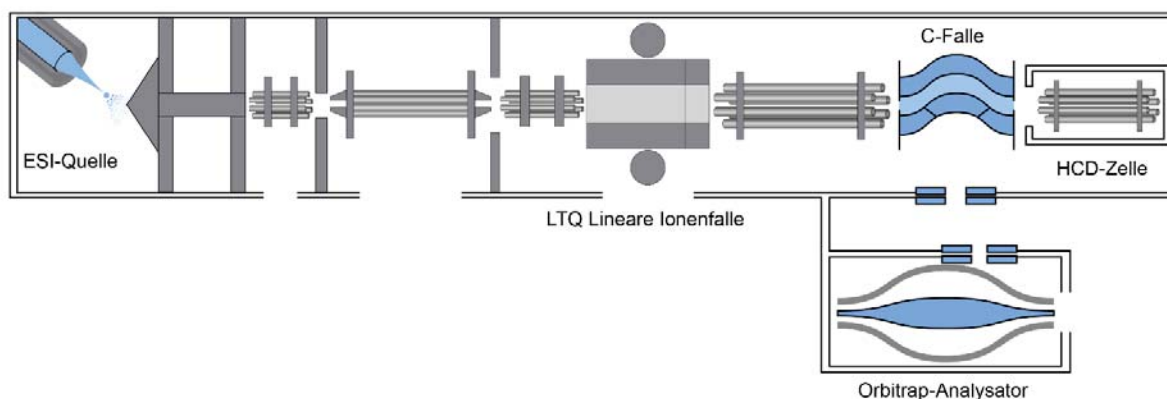


Abbildung 2. Aufbau eines Orbitrap XL-Massenspektrometers von Thermo Fischer Scientific. Die Ionen werden mit einer ESI-Quelle erzeugt und über ein System aus Multipolen in die lineare Ionenfalle oder direkt in die HCD-Zelle geleitet. CID findet in der linearen Ionenfalle statt, HCD in einer separaten Zelle. Um hochaufgelöste Spektren zu erhalten, können die Fragmentionen aus der linearen Ionenfalle und HCD-Zelle in den Orbitrap-Analysator geleitet werden. Abbildung geändert nach (33)

Nachdem das Molekülion in der linearen Ionenfalle mittels CID fragmentiert wurde, können die Fragmentionen entweder direkt analysiert werden, oder weiter in die Orbitrap für eine Hochauflösung geleitet werden. Wird HCD angewendet, werden die Fragmentionen anschließend direkt in die Orbitrap geleitet. Beide Fragmentierungstechniken simultan zu verwenden ist jedoch nicht möglich. Diese Instrumente mit mehreren Fragmentierungsmethoden öffnen den Weg zu kompetitiven Studien, die sich insbesondere auf die Unterschiede konzentrieren, die die einzelnen Anregungsprozesse auf die Fragmentionenverteilung haben. In beiden Techniken hat die Art des Stoßgases selbst keinen Einfluss auf die Fragmentierungswege.(A1)(23) So arbeitet CID oftmals mit Helium, während in der HCD-Zelle Stickstoff genutzt wird. Die übertragene Energie, welche bei beiden Techniken vergleichbar hoch ist, und die Anzahl der Stöße bzw. der Druck können zu Unterschieden führen.(23, 34) Bei der CID wird mit Drücken um 10^{-5} mBar gearbeitet, während in der HCD ca. 10^{-2} mBar verwendet werden. Bei der HCD wird die Anregungsenergie durch die Beschleunigung des Vorläuferiones entlang dieser gasgefüllten Ionenführung bestimmt und wirkt auf alle Ionen gleichermaßen. In CID regt die Kollisionsenergie selektiv die Frequenz eines Analyten der Wahl an. Als Ergebnis ist die Anregung in Bezug auf den m/z -Wert der Ionen in der Falle resonant und Energie wird nur auf das vorgewählte Vorläuferion übertragen (Abbildung 3 a).

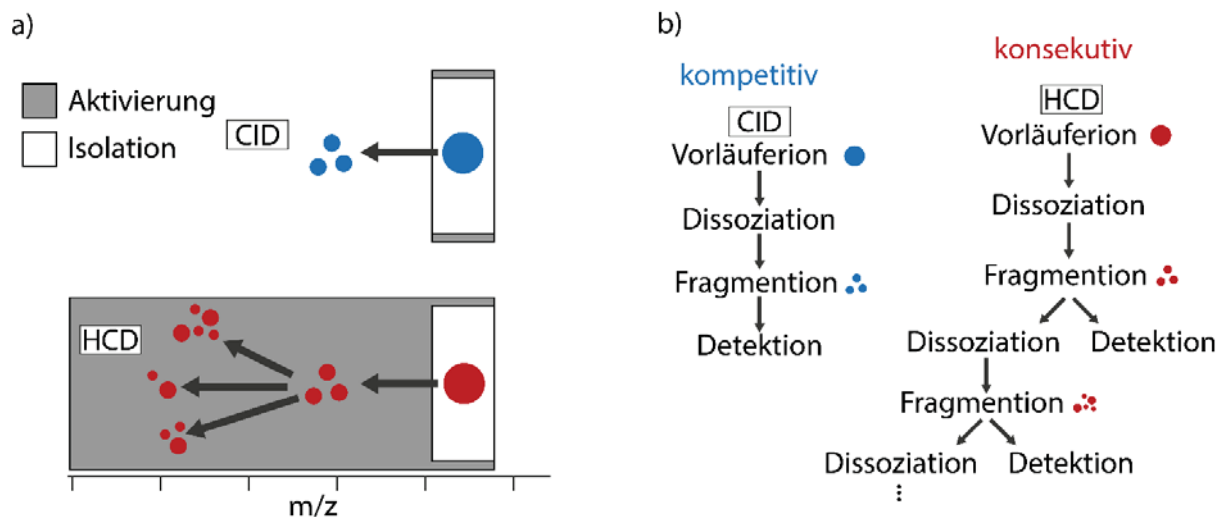


Abbildung 3. Vergleich der Dissoziation in CID und HCD.(26) a) Vergleich der Anregung des m/z -Bereiches der beiden Techniken. In CID ist der resonante Anregungsbereich und der Isolationsbereich gleich. HCD nutzt das gleiche Isolationsfenster, jedoch ist die Anregung nicht resonant.(35) b) Vergleich der Vorläufer- und der Reporterionen. In CID wird nur das Vorläuferion angeregt. Die gesamte Fragmentierung wird von diesem Energietransfer gespeist. Die Reaktion verläuft kompetitiv über alle offenen Kanäle. In der HCD wird eine Reihe aufeinanderfolgender Reaktionen durch nicht-selektive Anregung aller ionischen Spezies gespeist.

Im Falle der CID folgt die Fragmentierung also über konkurrierende Dissoziationskanäle. Der vergleichsweise niedrige Druck innerhalb der Falle macht eine zusätzliche Kollision unwahrscheinlich, wobei nur Dissoziation und interne Vibrationsreorganisation (IVR) zugänglich bleiben. Zusammenfassend postuliert diese mikroskopische Betrachtung der zugrundeliegenden Mechanismen, dass HCD vorwiegend Multi-Dissoziationskanäle besetzt, während in CID der Trend entgegengesetzt ist, was die Einzelkollisionsfragmentierung begünstigt (Abbildung 3 b). Dieser Unterschied ist entscheidend für die Ionen der zweiten Generation. Nach der ersten durch die anfängliche Kollision induzierten Fragmentierung erfahren die Reporterionen entweder eine zusätzliche Anregung durch das angelegte Feld (HCD), oder sie bleiben ungestört (CID).

Weitere Unterschiede fallen eher bei der Durchführung der Experimente auf. Mit CID ist ein schnellerer Scan möglich, jedoch gibt es in der Ionenfalle einen sogenannten *Low-Mass-Cutoff*. Das bedeutet, es können nur m/z -Verhältnisse bis zu etwa einem Viertel des Vorläuferions in der Falle stabilisiert und somit gemessen werden.(36, 37)

Des Weiteren weist CID eine höhere Empfindlichkeit auf, womit eine geringere Injektionszeit und höherer *Duty Cycle* einhergehen. Neuere HCD-Geräte können diese Nachteile jedoch mittlerweile überwinden.(37-39)

1.1.3. Strahlungsinduzierte Dissoziation

Neben dem Energieeintrag durch Stöße kann auch Strahlung zur Energieübertragung genutzt werden. Die Entwicklung der Photodissoziation in der MS reicht von der Verwendung von 10,6 μm (infrarot) bis zu 157 nm (Vakuum-UV). In Abhängigkeit von der Wellenlänge, können dabei sowohl hunderte als auch nur ein Photon für die Fragmentierung erforderlich sein.(40)

Die Infrarot-Multiphotonendissoziation (IRMPD) ist dabei an vorderster Stelle zu nennen. Sie findet besonders Anwendung in Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz(FT-ICR)-Geräten, welche die Ionen im Vergleich zu anderen Fallen sehr lange speichern können. IRMPD arbeitet in der Regel mit einem kontinuierlichen CO_2 -Laser, welcher mit einer Wellenlänge von 10,6 μm durch ein ZnSe - oder ein BaF_2 -Fenster in die ICR-Zelle strahlen kann.(13, 41, 42) Die in der Zelle gespeicherten Ionen können somit genau dosiert bestrahlt werden, um eine definierte Menge an Energie zu übertragen. Mit verschiedenen Einstrahlzeiten von ca. 5-300 ms können unterschiedliche Ionen zur Dissoziation gebracht werden.(43) Die Energie des IR-Photons wird durch einen bestimmten Schwingungszustand ($\sim 900 \text{ cm}^{-1}$) absorbiert und gibt die Energie an andere Schwingungsmodi ab, wodurch dieser wieder in den Ausgangszustand zurück gelangt und erneut ein Photon absorbieren kann.(44) Die lange Bestrahlungsdauer wird durch eine lange Verweilzeit in der Ionenfalle realisiert, wodurch eine anhaltende Energieübertragung durch die Aufnahme von IR-Photonen bis zur Fragmentierung ermöglicht wird. Diese hohe Anzahl an energieübertragenden Photonen ist nötig, da diese jeweils nur etwa 0,116 eV besitzen.(45, 46) Die schrittweise Anregung der Vibrationsmodi wurden bereits erfolgreich genutzt, um kleine Moleküle zu untersuchen.(11, 47) Nun wird diese Technik auch für MS/MS-Experimente an Biomolekülen genutzt. Im Vergleich zur CID generiert IRMPD dabei ähnliche Fragmentierungen, jedoch können bei IRMPD durch den Betrieb in der ICR-Zelle auch kleinere Fragmentionen stabilisiert und somit analysiert werden.(48)

Neben der IRMPD können in MS auch mittels Schwarzkörperstrahlung MS/MS-Experimente durchgeführt werden. Dabei werden ebenfalls IR-Photonen übertragen, was durch Aufheizen des Gerätes bis ca. 250 $^{\circ}\text{C}$ erreicht wird. Dabei entsprechen 250 $^{\circ}\text{C}$ laut dem Wienschen Verschiebungsgesetz $\sim 5,5 \mu\text{m}$. Die Fragmentierung ist in diesem Fall aufgrund der geringeren Strahlungsdichte noch langsamer und kann bis zu einigen Minuten dauern. Anwendung findet diese schwarzkörperstrahlungsinduzierte Dissoziation (BIRD) darum hauptsächlich in ICR-Zellen.(49)

Ein zwar nicht unbedingt neuer, jedoch erst in letzten Jahren umfänglicher betriebener Ansatz nutzt für die Fragmentierung ultraviolettes (UV) Licht. So arbeitet mittlerweile beispielsweise auch das Thermo Orbitrap Fusion Lumos Tribrid mit einer UV-basierten MS/MS-Technik, welche mit einer Wellenlänge von 213 nm arbeitet.(50) Diese Wellenlänge fällt dabei in den Bereich des fernen UV-Lichtes (200-280 nm). Andere laserbasierte Methoden setzen, aufgrund der höheren Energie, eher auf sogenanntes Vakuum-UV-Licht, welches von 100 bis 200 nm reicht und seinem Namen dem Umstand verdankt, dass in diesem niedrigen Wellenbereich die Strahlung von Teilchen in der Luft absorbiert wird.(51) Üblicherweise werden zu diesem Zweck Laser der Wellenlängen 157 und 193 nm (F₂- und ArF-Gaslaser) genutzt, wobei die Photonen Energien von 7,9 bzw. 6,4 eV aufweisen.(52, 53) Zumeist werden dabei Ionenfallen wie ICRs genutzt, um die Ionen auf bekannten Bahnen möglichst einfach mittels Laser bestrahlen zu können. Andere Ansätze fragmentieren hingegen schon in der Ionenquelle oder nutzen Time of Flight (ToF)-MS. Auch lineare Ionenfallen wurden genutzt, sowie die HCD-Zelle einer Orbitrap.(40, 54-56)

Schon 1984 wurden Ionen von Di- und Tripeptiden mittels Licht der Wellenlänge 193 nm bestrahlt und untersucht, größere Peptide folgten nach der Einführung von ESI und MALDI.(52) Im Vergleich zu Wellenlängen des fernen UV-Lichtes (266 nm, 248 nm) zeigte sich dabei eine signifikant höhere Fragmentierungseffizienz bei der Untersuchung von Peptiden (56) und eine hohe Sequenzabdeckung, aufgrund der Bildung ganzer y-Serien (siehe Kapitel 1.3).(57-59) Durch die Bildung einer hohen Anzahl von a-, b-, c-, x-, y- und z-Fragmenten konnten für typische Peptide bereits komplette Sequenzen erhalten werden.(60, 61) Peptide, welche aromatische Seitenketten enthielten, wiesen dabei eine deutlich höhere Dissoziationseffizienz auf, da diese bei 266 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen.(56, 60) Ein weiterer dominanter Reaktionsweg bei der Bestrahlung von Ionen mit UV-Licht ist der Elektronenverlust. Dies führt in der Folge zu einem ladungsreduzierten Radikal.(62-65) Bei der Analyse von Glykanstrukturen mit CID werden vorrangig B/Y- und C/Z-Fragmente gebildet.(66) Insbesondere Sialinsäure kann jedoch ohne Derivatisierung nur schwer nachgewiesen werden, da diese als Neutralverlust nicht zu beobachten ist. Brodbelt *et al.* konnte mittels VUV Fragmentierung nicht nur A- und X-Fragmente in hoher Abundanz erzeugen, sondern darüberhinaus konnte ein Massenverlust beobachtet werden, welcher typisch für den Verlust von Sialinsäure ist.(40, 67)

Ähnliche Studien wurden für Strahlung mit einer Wellenlänge von 157 nm durchgeführt. Für Peptide zeigte sich beispielsweise eine ladungsabhängige Dissoziation. Bei argininhaltigen,

einfach geladenen Peptiden konnten Reilly *et al.* als dominanten Dissoziationsweg die Bildung von Fragmenten des Typs a und x feststellen, sowie Fragmente der Seitenketten (namentlich v-Fragmente), bei zweifach geladenen Peptiden wurden b- und y-Fragmente wie auch in CID-Experimenten analysiert.(53) Erklärt wurde dieser Verlust der Dissoziationsspezifität mit dem Vorhandensein von mobilen Protonen, welche durch ihre Bindung an das Peptidrückgrat die Photochemie durch Schwächung der benachbarten Bindung verändern können. Außerdem konnte ein vermindertes Signal-Rausch-Verhältnis trotz eines höheren Informationsgehaltes der Fragmente beobachtet werden.(53, 68) In anderen Experimenten konnten wiederum dominante Fragmente, welche aus der Dissoziation der Seitenketten resultierten, erzeugt werden.(69) Der Vorteil lag dabei insbesondere an der möglichen Unterscheidung von Leucin und Isoleucin aufgrund der w-Fragmente.(70, 71) Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Disulfidbrücken effizient homolytisch gespalten werden können, wobei zwei Radikale entstehen.(72) Ebenso wurden Oligosaccharide auf ihr Fragmentierungsverhalten bei der Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 157 nm im Vergleich zu CID betrachtet. Dabei wurden ähnliche Spektren mittels linearer Ionenfalle und ToF-MS erzeugt, wobei die CID bessere strukturellen Informationen lieferte.(56)

Im Vergleich beider Wellenlängen wurde bei Peptiden und 157 nm eine Verschiebung hin zu höheren m/z -Verhältnissen der Fragmente beobachtet. Insgesamt schien jedoch das MS an sich eine ebenso große Rolle bei diesen Experimenten zu spielen, wie die Wellenlänge.(56, 70) Zuletzt wurde auch eine lineare Ionenfalle an eine Synchrotronstrahlungsquelle gekoppelt, um auch VUV-Licht anderer Wellenlängen als 157 und 193 nm nutzen zu können.(73, 74)

Insgesamt absorbieren viele organische Moleküle effizient Licht vieler Wellenlängen. Aufgrund dieser Tatsache wurden in den letzten Jahren immer mehr unterschiedliche Stoffklassen, wie Glykopeptide, Glykane oder auch Lipide in UV-laserbasierten MS/MS-Experimenten untersucht.(67, 75-80) Die Möglichkeit der Erzeugung einzigartiger Fragmente, sowie der gleichzeitigen Photoaktivierung von Vorläufer- und Fragmentionen ermöglicht einen signifikanten Informationsgewinn und lässt diese Entwicklung weiter voran schreiten.(40)

1.2. Ionenmobilitätsspektrometrie

Komplexe Gemische zu trennen und anschließend gezielt einzelne Fraktionen zu analysieren, ist für die Untersuchung von realen Proben in der molekularen MS, insbesondere für biologische, oftmals essentiell, um die Fülle an Informationen regulieren zu können. Bislang

werden zu diesem Zweck hauptsächlich chromatographische und elektrophoretische Methoden verwendet.(81-85) Trotzdem stellt die Separierung von Substanzen mit marginalen strukturellen Unterschieden und somit sehr ähnlichen physiko-chemischen Eigenschaften weiterhin ein Problem dar. Jedoch sind gerade bei biologischen Fragestellungen teils kleinste strukturelle Veränderungen von grossem Interesse. Diese zu identifizieren, insbesondere bei identischem m/z -Verhältniss, kann bisweilen eine große Herausforderung darstellen. Die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS), vor allem mit einer MS-Kopplung (IM-MS), bietet dabei völlig neue Möglichkeiten. Nachdem die Probe z.B. durch eine ESI-Quelle ionisiert wurde, wird sie in eine sogenannte Driftzelle geleitet, welche mit einem neutralen Gas (z.B. He oder N_2) gefüllt ist. In der Zelle herrscht ein schwaches elektrisches Feld, welches dafür sorgt, dass sich die Ionen durch die Zelle bewegen.(86, 87) Dabei kollidieren die Ionen mit dem neutralen Gas und werden abgebremst, ohne jedoch zu fragmentieren. Die Geschwindigkeit, mit der die Ionen die Zelle passieren, hängt dabei von ihrer Masse, der Ladung und von ihrer Struktur ab. Somit können Ionen mit einem identischen m/z -Verhältnis und unterschiedlicher Struktur getrennt werden. Die Länge der Driftzelle, die angelegte Spannung, sowie die Temperatur sind dabei entscheidend für die Auflösung. Es muss aber beachtet werden, dass es zu einer Verbreiterung der Peaks aufgrund der Abstoßung der Ionen innerhalb der Ionenwolke und durch Diffusion kommen kann. Dieser Effekt wird durch eine längere Driftzelle noch begünstigt (Abbildung 4).(88-92)

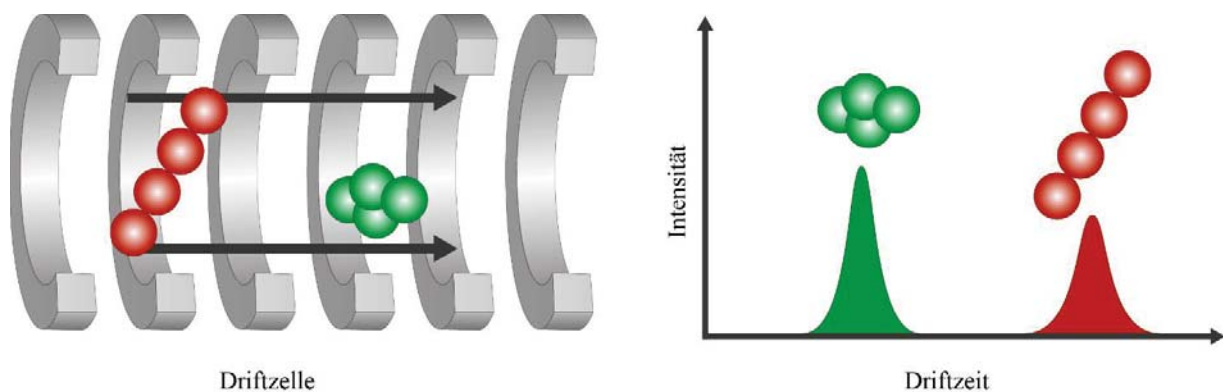


Abbildung 4. Schema einer Driftzelle (links), in welcher zwei Substanzen mit gleichen m/z -Werten durch unterschiedliche Driftzeiten getrennt werden (rechts). Abbildung geändert nach (93)

Aus den erhaltenen Driftzeiten kann anschließend ein Wirkungsquerschnitt auch *collisional cross section* (CCS) genannt, berechnet werden, welcher von den Geräteparametern unabhängig ist. Die CCS eines Ions ist abhängig von dessen Konformation und beschreibt eine rotationsgemittelte Fläche, mit welcher das Driftgas kollidiert. Kleine Ionen werden dabei nur durch wenige Stöße mit dem Driftgas gebremst, während größere Ionen einer Vielzahl von

Kollisionen ausgesetzt sind und somit langsamer durch die Zelle driften. Die berechneten CCS können somit unabhängig vom Gerät untereinander verglichen werden und spiegeln molekülspezifische Kenngrößen wieder.(87, 94, 95) In dieser Arbeit wurde ein Synapt G2-S mit einer linearen Driftzelle genutzt, welches nach Allen *et al.* umgebaut wurde, um mit einem gleichmäßigen Feld arbeiten zu können.(96) Der Vorteil gegenüber anderen Formen wie einem wellenförmigen elektrischen Feld in der Driftzelle, liegt in der einfachen Berechnung der CCS. Im Gegensatz zu einem gleichmäßigen Feld hat ein wellenförmiges Feld jedoch den Vorteil, dass durch die Bewegung der Ionen auf den Wellen eine etwa dreifach höhere theoretische Driftzellenlänge und damit eine höhere Auflösung erzielt werden kann.

IMS für sich genommen wurden in den letzten Jahrzehnten hauptsächlich zur Untersuchung von kleinen Analyten wie Sprengstoffen oder Betäubungsmitteln auf Flughäfen genutzt.(97) Die Kopplung eines IMS mit einem MS ermöglicht eine verbesserte Trennung von ähnlichen Substanzen wie Isomeren bei gleichzeitiger Erfassung der m/z -Werte. Gerade in der Bioanalytik eröffnet die IM-MS völlig neue Möglichkeiten. Insbesondere da diese Instrumentenkombination inzwischen auch kommerziell erhältlich ist, hat sich das Einsatzfeld stark vergrößert. So können nun auch große Biomoleküle unkompliziert mittels IM-MS analysiert werden. Amyloide Peptide und Proteine beispielsweise spielen eine große Rolle bei Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson. Dabei kommt es zu einer Proteinumfaltung von einer löslichen, partiell gefalteten Form hin zu unlöslichen Amyloid-Fibrillen. Seo *et al.* konnten diese Umfaltung, sowie die Übergangsformen, welche für die Toxizität verantwortlich zu sein scheinen, nachweisen.(98-100) Des Weiteren stellt z.B. die Analyse von komplexen Glykanen noch immer ein Problem dar. Oftmals muss aufwendig derivatisiert werden, um diese überhaupt analysieren zu können. Generell ist die Identifikation von Zuckern an Peptiden und Proteinen oftmals problematisch. Mittels IM-MS jedoch konnten Hofmann *et al.* zeigen, dass nicht nur einfache Monosaccharide wie Glucose von Galactose voneinander unterschieden werden können, auch komplexe Polysaccharide und deren Position an Peptiden konnten differenziert werden. So konnten zwei Peptide mit gleicher Sequenz unterschieden werden, welche an unterschiedlichen Positionen jeweils die gleiche komplexe Glykanstruktur trugen.(101, 102) Des Weiteren konnten solche Strukturen auch durch MS/MS-Experimente mit anschließender Bestimmung der CCS der Fragmente identifiziert werden. Die Möglichkeit, vor der Driftzelle eine Fragmentierung zu betreiben, erlaubt die Analyse eines sogenannten Fingerprints, welcher sich durch ein typisches Fragmentspektrum mit zugeordneten CCSs auszeichnet. Insgesamt lässt sich zusammenfassend sagen, dass die IM-MS ein großes Potential besitzt, Einzug in die Routine der Bioanalytik zu halten.(98-102)

1.3. DNA – Komplexität als analytische Herausforderung und Chance

Die Analyse von großen Biomolekülen mittels MS gehört heutzutage in der Bioanalytik zur Routine. Während Lipide, Proteine und deren posttranslationalen Modifikationen, sowie Metaboliten mit MS analysiert werden, wird DNA-Analytik nur selten mittels MS durchgeführt.(103-108) DNA als Träger der Erbinformation liegt *in vivo* normalerweise als Doppelhelix, bestehend aus vier Nukleobasen (Guanin, Adenin als Purinbasen, Thymin, Cytosin als Pyrimidinbasen) an einem Desoxyribose-Phosphatrückgrat, vor. Als ESI und MALDI-MS zur Routine wurden, ging man zunächst davon aus, dass die Sequenzanalyse der DNA ähnlich praktikabel vonstattengehen müsste wie die von Proteinen.(107) Doch während Proteine bzw. Peptide recht einfache MS/MS-Spektren mit hauptsächlich b- und y-Fragmenten liefern, welche automatisch ausgewertet werden können, fragmentiert die DNA sehr viel komplexer. McLuckey *et al.* haben hierfür eine Fragmentnomenklatur etabliert, welche an die von Fohlmann und Roepstorff zur Proteinfragmentbenennung angelehnt ist.(109, 110) Zwar können die Fragmentklassen, wie auch bei Proteinen, je nach Fragmentierungsmethode variieren, jedoch besitzt das DNA-Rückgrat nicht nur eine Bruchstelle mehr als Proteine, auch die Basen können neutral oder als Ion abgespalten werden (Abbildung 5).(109, 110)

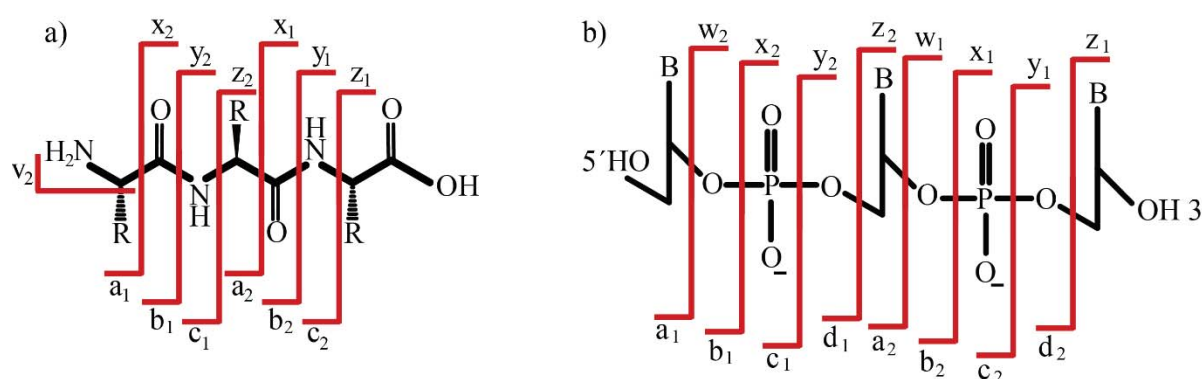


Abbildung 5. a) Fragmentierungstellen bei MS/MS-Experimenten in Proteinen/Peptiden. b) Fragmentierungstellen bei MS/MS-Experimenten in DNA.(109, 110)

Im Gegensatz zu Proteinen/Peptiden findet bei der MS/MS von DNA oftmals nicht nur ein Bruch des Rückrates pro Baustein statt, sondern eine multiple Fragmentbildung kann beobachtet werden. Das heißt, alle Fragmente (a-d/w-z), sowie zusätzliche Basenverluste (einfach oder mehrfach) werden erzeugt. Die Bildung der Fragmente hängt dabei stark von der Sequenz, dem Ladungszustand und der Art der Basen ab.(111) Die Komplexität der Spektren macht somit eine Sequenzierung von Strängen mit mehr als 100 Basenpaaren schwierig. Daher wird die MS in Bezug auf die DNA-Analytik meist nur genutzt, um molekulare Details wie die

Identifizierung und Lokalisierung von modifizierten Basen oder Einzelnukleotidpolymorphismen zu untersuchen. (38, 39, 107, 112-114)

Nichtsdestotrotz stellt DNA nicht nur durch ihre Bedeutung in Organismen, als auch unter anderem mit ihrer Fragmentkomplexität beim Bruch kovalenter Bindungen, sowie der Bildung einer nicht-kovalenten Bindung zu einem komplementären Strang eine vielseitige und interessante Probe für die Untersuchung des Gasphasenverhaltens von Biomolekülen in der MS dar. DNA kann ionisiert in der Gasphase mittels MS auf viele verschiedene Arten beobachtet werden. Sie kann als Einzelstrang vorliegen, oder sie bildet zu einem komplementären Strang über Basenpaarungen zwei Wasserstoffbrückenbindungen bei Adenin-Thymin (AT) und drei bei Guanin-Cytosin (GC) einen Doppelstrang aus. Diese Paarungen wurden von Watson und Crick erstmals 1953 beschrieben (Abbildung 6).(115)

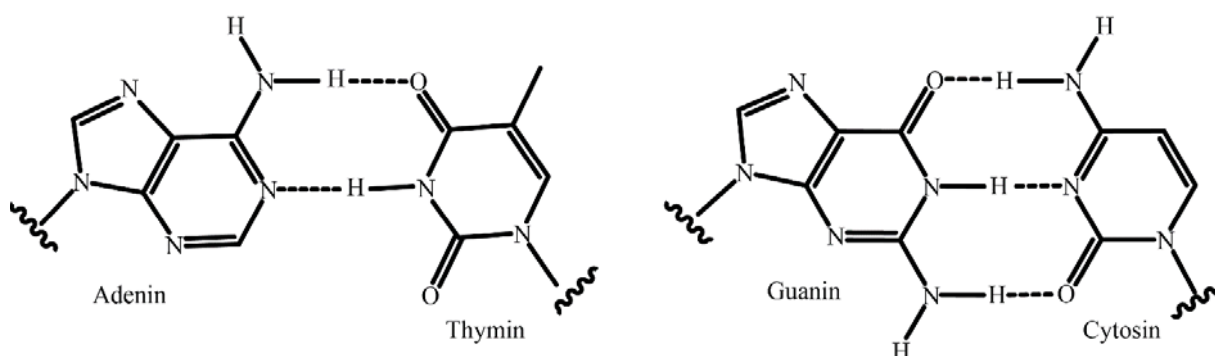


Abbildung 6. Basenpaarung nach Watson und Crick. Dabei bildet Adenin zu Thymin und Guanin zu Cytosin Wasserstoffbrücken aus, die den Doppelstrang stabilisieren.(115)

Die Bildung und Stabilität von Doppelsträngen hängt von vielen Faktoren ab, von denen einige insbesondere im MS eine Herausforderung darstellen können. Die Stabilität eines Doppelstranges hängt beispielsweise stark von der Länge des Strangs, dem GC-Anteil und der Basenreihenfolge innerhalb des Stranges ab. Ein höherer GC-Anteil bedeutet mehr Wasserstoffbrückenbindungen und somit eine stabilere Bindung zum komplementären Strang. Endständige GC-Paarungen stabilisieren einen Doppelstrang besser als eine Anordnung der GC Paarung innerhalb des Strangs. Zwar können Doppelstränge in der flüssigen Phase meist problemlos gebildet werden, jedoch kann es in der Gasphase schwierig sein, in höheren Ladungszuständen Bedingungen zu finden, unter denen die nicht kovalente Bindung erhalten bleibt. In der flüssigen Phase werden zur Hybridisierung Salze wie Magnesiumchlorid genutzt. Diese können jedoch den Ionisierungsprozess in ESI und MALDI stören und müssen durch andere Substanzen ersetzt werden. Des Weiteren wird die Hybridisierung von organischen

Lösungsmitteln gehemmt. Diese sind jedoch notwendig, um eine schnelle Verdampfung und Überführung in die Gasphase im MS zu ermöglichen.(116-121)

DNA kann durch Anlagerung von Protonen an die Nukleobasen im positiven, sowie durch Protonenverlust am Phosphat im negativen MS-Modus analysiert werden. Besonders interessant ist diese Eigenschaft aufgrund der Tatsache, dass bei DNA-Strängen bis zu jede dritte Base ein Proton tragen kann, bzw. mehr als zwei Drittel aller Phosphate deprotoniert vorliegen können, um somit eine breitere effektive Ladungsserie als bei Proteinen zu erhalten. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass der Ladungszustand massiv das Fragmentmuster in MS/MS-Experimenten beeinflussen kann.(111) Diese ladungsabhängige Dissoziation wurde mit dem Konzept des Ladungsniveaus beschrieben, welches das Verhältnis von Ladungen in Bezug zur Gesamtanzahl der Phosphatgruppen erklärt.(122) Dieses Ladungsniveau kann sich aufgrund der Wechselwirkungen der Ladungen auf die gesamte Geometrie des Ions auswirken und spielt eine Rolle bei der Stabilisierung von Ionen in der Gasphase.(86)

Insgesamt ermöglicht DNA durch ihre komplexe Fragmentierung und durch die Vielzahl verschiedener Dissoziationskanäle, Unterschiede in den verschiedenen MS/MS-Techniken zu identifizieren. Diese Unterschiede im Fragmentierungsmuster bilden die Möglichkeit, durch verschiedene Techniken mehr Informationen über die Moleküle zu erhalten. Außerdem machen die verschiedenen Eigenschaften DNA zu einem idealen Testmolekül für neuartige analytische Verfahren, die die Struktur und Reaktivität von isolierten Biomolekülen in der Gasphase untersuchen.

1.4. *Locked Nucleic Acids*

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche DNA-Analoga als oligonukleotid-basierte Therapeutika entwickelt. Diese können beispielsweise zur sogenannten Antisense-therapie eingesetzt werden. Dabei sollen durch Hybridisierung gezielt *messenger*-Ribonukleinsäuren (mRNA) blockiert werden, welche sonst von Ribosomen in Proteine übersetzt werden.(123-125) Da mRNA für die Translation in Proteine als Einzelstrang vorliegen muss, wurden Substanzen entwickelt, welche RNA bzw. DNA zwar ähnlich sind, um keine toxische Wirkung auf den Organismus zu haben, sich aber trotzdem so weit unterscheiden, dass sie nicht enzymatisch z.B. von Exo- und Endonukleasen abgebaut werden können.(123, 126, 127) Diese Substanzen können dann einen Doppelstrang mit der mRNA bilden und verhindern somit die Translation in Proteine. Dadurch könnten beispielsweise Symptome verschiedener

Krankheiten wie Huntington oder die spinale Muskelatrophie therapiert werden, indem die Proteinexpression gehemmt wird.(128, 129) Eine dieser Analoga sind *Locked Nucleic Acids* (LNAs). LNAs wurde von Imanishi *et al.* und Wengel *et al.* Ende der 90er Jahre entwickelt. Diese modifizierte RNA besitzt eine zusätzliche Verbrückung zwischen dem 2'- und dem 4'-Kohlenstoff der Ribose. Dadurch ist LNA unflexibler als normale RNA und erhöht die Schmelztemperatur des Doppelstrangs, d.h. sie unterstützt die Hybridisierung und erhöht die Stabilität des Doppelstrangs (Abbildung 7).

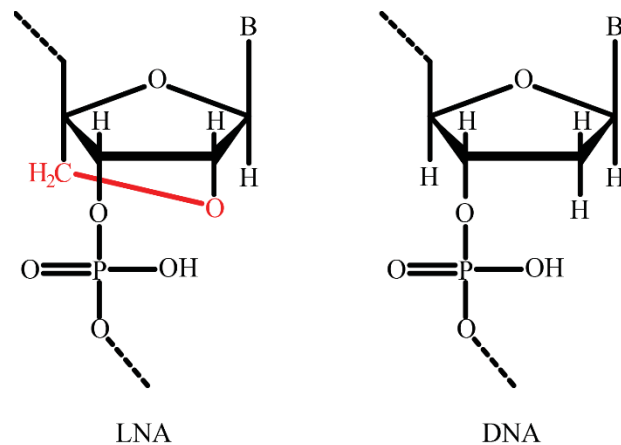


Abbildung 7. Vergleich von LNA (links) und DNA (rechts). Die LNA enthält eine zusätzliche Verbrückung (rot).

LNA-Nukleotide können während der Festphasensynthese in eine DNA oder RNA eingebaut werden und weisen ähnliche physikalische Eigenschaften wie RNA und DNA auf, so beispielsweise auch die gute Wasserlöslichkeit. Durch die hohe Zielspezifität kann der Strang anschließend direkt an die Zielsequenz binden und die Translation unterbinden.(126, 130, 131) Massenspektrometrisch sind diese Substanzen zwar schon untersucht, aber noch nicht umfassend charakterisiert worden. So wurde bislang zwar die Fragmentierung im MS untersucht, jedoch nur mit geringen sequenziellen Unterschieden innerhalb des Strangs.(132, 133)

2. Schlussfolgerungen für die aktuelle Arbeit und Zielstellung

In der Massenspektrometrie ist es heutzutage Routine, Bioanalytik an großen Molekülen, wie beispielsweise an ganzen Proteinen durchzuführen. DNA wird dabei eher selten einer genaueren Betrachtung unterzogen. Die umfangreichen und komplizierten Strangbrüche in MS/MS-Experimenten führten dazu, dass MS oftmals nur bei sehr speziellen Analysen genutzt wird. Die Fragmentierung, gerade von Einzelstrang-DNA wurde bereits in den 90er Jahren ausführlich diskutiert, allerdings in größeren Rahmen nur für die CID. Da viele mechanistische Aspekte bis heute noch ungeklärt sind, soll in dieser Arbeit nicht nur eine umfassende Studie zum Fragmentierungsverhalten während des CID-Prozesses, sondern auch mit verwandten Techniken durchgeführt werden, um nähere Erkenntnisse zu gewinnen. Anschließend soll überprüft werden, ob sich die gewonnenen Erkenntnisse ebenfalls auf ein DNA-Analogon übertragen lassen. Dieser Ansatz umfasst sowohl Einzel- als auch Doppelstränge, welche mit ihren nicht kovalenten Bindungen attraktive Modelstrukturen darstellen. Außerdem soll auf die Gasphasenstruktur solcher Molekülionen eingegangen werden, um ihre Struktur im Vakuum zu untersuchen. Zu diesem Zweck soll die Ionenmobilität genutzt werden, welche sich in der Vergangenheit schon durch die Aufklärung zahlreicher struktureller Fragestellungen bewährt hat. Insbesondere die Kombination mit MS ermöglicht umfassende Studien zu strukturellen Varianten.

Des Weiteren sollten nicht nur etablierte MS/MS-Methoden wie die CID, genutzt werden, sondern auch ein neuer Ansatz der DNA-Fragmentierung verfolgt werden. Die bereits bekannte Möglichkeit einer DNA-Schädigung durch energiereiche UV-Strahlung soll dabei als Grundlage für eine neue MS/MS-Methode dienen. Eine Gasentladungslampe (D_2) als kontinuierliche VUV-Strahlungsquelle, welche über ein breites Spektrum bis zu ≥ 115 nm verfügt, soll in einer Ionenfalle als neue Fragmentierungstechnik untersucht werden.

Diese Arbeit basiert auf folgenden Publikationen:

S. Ickert, J. Riedel, S. Beck, M.W. Linscheid, A Novel Tandem MS Method based on Vacuum Ultraviolet Radiation, in preparation

S. Ickert, T. Schwaar, A. Springer, M. Gabarics, J. Riedel, S. Beck, K. Pagel, M.W. Linscheid, Stability of Nucleic Acids in the Gas Phase – a Comprehensive Study by Tandem MS and Ion Mobility Spectrometry, submitted.

Patent: J. Riedel, S. Ickert, Gezielte spezifische Fragmentierung und Postionisation von Analytionen in einem Massenspektrometer mittels Exposition gegenüber einer Vakuum-UV-Strahlungsquelle, **2017** angemeldet durch die Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung unter dem amtlichen Aktenzeichen 10 2017 122 606.0.

S. Ickert, J. Riedel, S. Beck, M.W. Linscheid, Fragment Formation of Oligonucleotides in Collision Induced Mass Spectrometry Experiments, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2018**, 32(7), 597.

S. Ickert, J. Hofmann, J. Riedel, S. Beck, K. Pagel, M.W. Linscheid, From Solution to Isolation: Non covalent Interactions Stabilize Compact Structures of DNA Oligomers in the Gas Phase, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2018**, 24(2), 225.

3. Ergebnisse & Diskussion

Zunächst soll das Gasphasenverhalten von einzelsträngiger DNA und LNA im MS betrachtet werden. Im Folgenden sollen dann verschiedene MS/MS-Methoden in Hinblick auf die Fragmentbildung verglichen werden. Wie bereits beschrieben, kann DNA im negativen Modus unter der Bildung zahlreicher Ladungszustände beobachtet werden. Im Gegensatz zu beispielsweise einer Analyse von Peptiden im positiven Modus mit einer hohen relativen Intensität, kann bei einer Einzelstrang-DNA im negativen Ionenmodus nur eine mittlere Intensität an Thermo Fischer Massenspektrometern erreicht werden. MS/MS-Methoden gehen in der Regel mit einem Intensitätsverlust von 2-3 dekadischen Größenordnungen einher. Fragmentsignale mit geringer Intensität können jedoch nur schwerlich ausgewertet werden, da sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis mit jeder Größenordnung signifikant verschlechtert. Durch einen solchen Intensitätsverlust war es nicht möglich, hochaufgelöste Spektren aufzunehmen, außer von sehr kleinen Oligonukleotiden, welche nur vier Basen enthielten. Es ist also von größter Wichtigkeit, alle Parameter bezüglich der Signalintensitäten ausführlich zu optimieren. Einstrang-DNA wurde daher im Folgenden immer in einer Konzentration von 10 μM in 30 % Methanol mit 1 % Triethylamin analysiert. Die Transferkapillarentemperatur betrug dabei stets 100 °C. Doppelstränge als nicht-kovalente Verbindungen im MS untersuchen zu können, erfordert jedoch aufgrund wiederum geringerer Intensitäten, insbesondere durch auch Adduktbildung mit Natriumionen, andere Konditionen. Eine Konzentration an 10 μM DNA sowie 20 % Isopropanol erwies sich als geeignet. Triethylamin konnte die Signalintensität bis zu einem Gehalt von etwa 0,2-0,3 % erhöhen. Für die Bildung von Doppelsträngen, sowie zur Verhinderung von Natriumaddukten wurde Ammoniumacetat hinzugefügt. Die optimale Konzentration, bei der zwar eine Intensitätssteigerung aufgrund geringerer Addukte, jedoch noch kein vermehrtes Rauschen auftrat, betrug hier 50 mM. Die Transferkapillarentemperatur wurde für jeden Doppelstrang auf ein Optimum zwischen 350 und 400 °C variiert. Alle folgenden Messungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, unter diesen Konditionen durchgeführt.

3.1. Allgemeines Gasphasenverhalten von DNA

3.1.1. Ladungsgetriebene geometrische Reorganisation von Einzelsträngen

Zunächst wurde die für eine CID Fragmentierung notwendige Energie bei Einzelstrang-DNA untersucht. Dabei lag der Focus nicht auf der Art der gebildeten Fragmente. Besonders interessant ist dieses Experiment, wenn es über alle Ladungszustände durchgeführt wird, da aufgrund der sehr hohen Ladungszustände ladungsbedingte Unterschiede analysiert werden können. Zu diesem Zweck wurden zunächst 15-mere verwendet, welche in Ladungszuständen zwischen 3- und 11- beobachtet wurden (Abbildung 8).

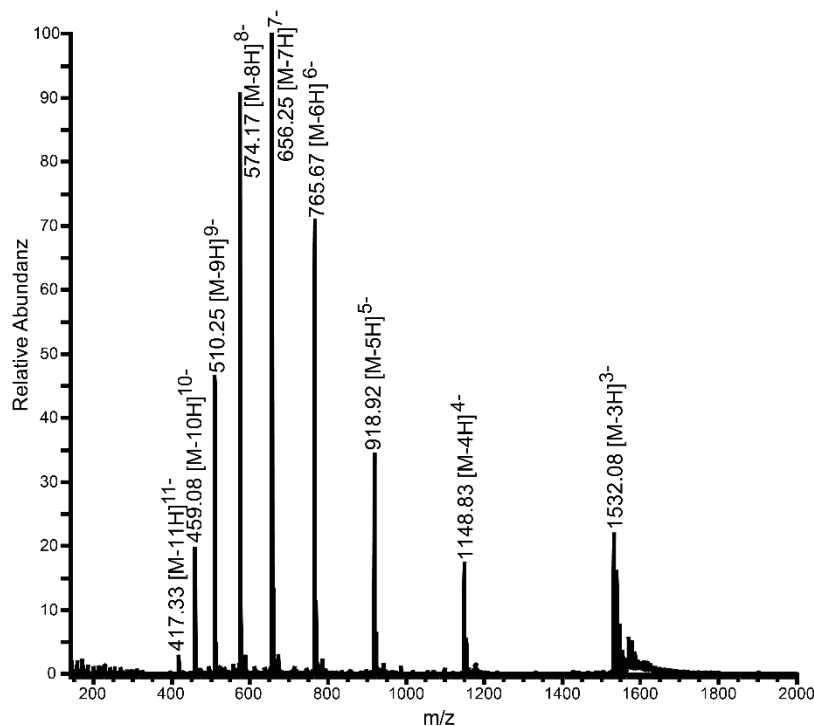


Abbildung 8. Ladungsserie eines 15-mer DNA Stranges mit den Ladungszuständen 3- bis 11-.

Das CID-Experiment wurde zunächst an acht verschiedenen 15-meren durchgeführt, wobei die Sequenz bzw. der GC-Anteil von 0 bis 100 % variiert wurde (Anhang Tabelle A1). Die aufgewendete Fragmentierungsenergie wurde hier immer relativ in % angegeben, da keine Angabe in eV vom Hersteller des MS zur Verfügung stand. Es wurden CID-Experimente an allen detektierbaren Ladungszuständen durchgeführt. Zuvor konnte gezeigt werden, dass der Ladungszustand einen erheblichen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten ausübt.(111) Des Weiteren ist bekannt, dass der bevorzugte Fragmentierungsweg in diesem Experiment einen Basenverlust verursacht.(111, 134-136) So konnte auch in den vorliegenden

Experimenten aller 15-mere in fast allen Fällen ein Basenverlust als intensivstes Signal identifiziert werden. Ein 15-mer besitzt 14 Phosphatgruppen im DNA Rückgrat. Exemplarisch soll hier nun das 15-mer 5'-AAA TAA GGC CGC TAT-3' betrachtet werden. In den MS/MS-Spektren der Ladungszustände 3- bis 7- konnte das Fragment [M-A] als neutraler Basenverlust mit einer hohen Signalintensität beobachtet werden, wobei ab einer Ladung von 6- im Fragmentspektrum ebenfalls das Fragment $[M-A]^{5-}$ auftrat, welches den Verlust eines negativ geladenen Adeninrestes aufzeigt. Bei einer Nettoladung von 7-, also sobald das gesamte Oligonukleotid ein Ladungslevel von 0,5 erreicht, womit im Schnitt jedes zweite Phosphat negativ geladen ist, sind diese beiden Signale fast gleich stark ausgeprägt (Abbildung 9 a). Für die Ladungszustände 8- bis 10- wurde der negative Basenverlust mit der stärksten Abundanz erfasst, während der neutrale Adeninverlust fast direkt auf null zurückging (Abbildung 9 b)

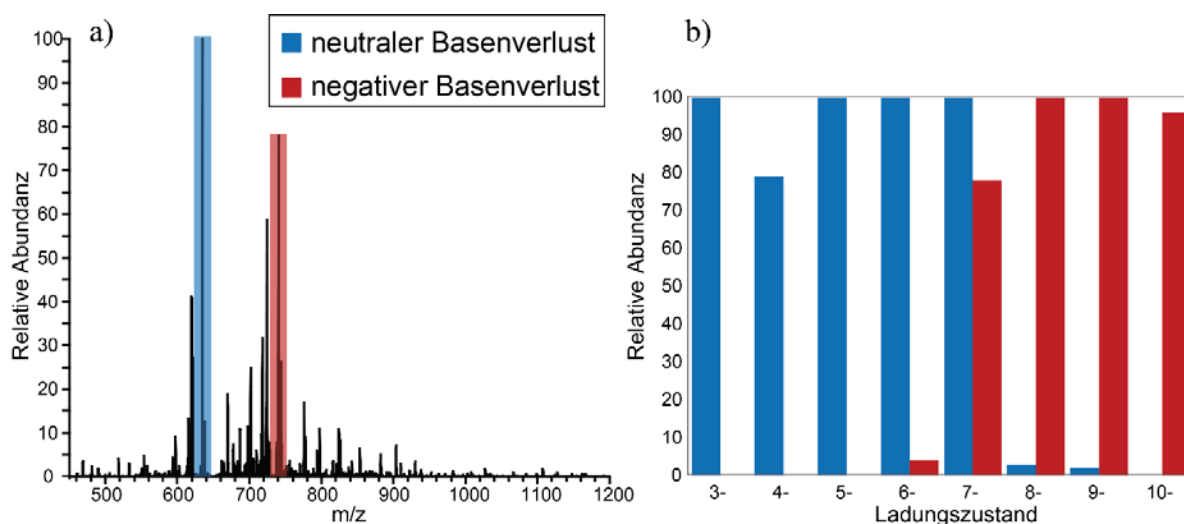


Abbildung 9. ESI-MS/MS-Ergebnisse des 15-mers 5'-AAA TAA GGC CGC TAT-3' a) MS/MS-Spektrum des siebenfach negativ geladenen 15-mers. Der bevorzugte Fragmentierungsweg generiert einen neutralen Basenverlust $[M-A]^{7-}$ bei m/z 634,7 (blau) und einen negativen Basenverlust $[M-A]^{6-}$ bei m/z 740,6 (rot) mit relativen Signalintensitäten von 100 % und 79 %. b) Vergleich der relativen Intensitäten des neutralen, sowie des negativen Adeninverlustes der Ladungszustände 3- bis 10-.

Eine Erklärung für dieses Phänomen liefert die Coulombabstoßung gleicher Ladungen. Je höher die Nettoladung des Strangs ist, also je höher das Ladungslevel, desto höher wird infolgedessen die interne Coulombabstoßung, wodurch das Bestreben des Ions steigt, eine Ladung abzugeben. Realisiert wird dies dann über den priorisierten Dissoziationsweg, wobei nicht nur eine Base abgespalten wird, sondern das Vorläuferion auch eine Ladung verliert. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurden an insgesamt 27 Oligonukleotiden CID-Experimente durchgeführt, um ebenfalls Abhängigkeiten von der Länge, der Sequenz und der Ladung zu klären (Tabelle A1). Dabei wurde von jedem Molekülion jeder detektierbare

Ladungszustand isoliert und die relative Kollisionsenergie beginnend bei 0 %, in 0,1 % Schritten erhöht. Es konnte ein scharfer Fragmentierungspunkt ermittelt werden, bei dem nahezu das gesamte Vorläuferion dissoziierte (Abbildung 10).

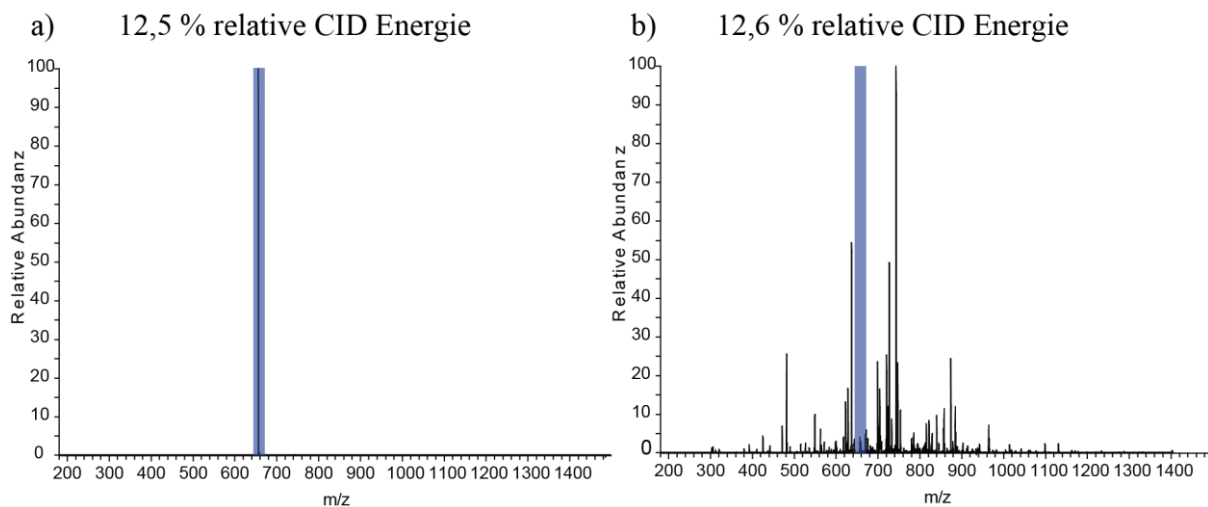


Abbildung 10. ESI-MS-Spektrum des siebenfach negativ geladenen Oligonukleotids 5'-AAA TAA GGC CGC TAT-3'. a) Isoliertes Vorläuferion m/z 656,1 während der CID Aktivierung mit 12,5 % relativer Kollisionsenergie. b) Isoliertes Vorläuferion m/z 656,1 während der CID-Aktivierung mit 12,6 % relativer Kollisionsenergie. Das Vorläuferion ist blau markiert.

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Fragmentierung des 15-mers 5'-AAA TAA GGC CGC TAT-3' im Ladungszustand 7-. Bei einer relativen Kollisionsenergie von 12,5 % sind keine Fragmente zu erkennen, wird jedoch die Energie nur um 0,1 % erhöht, dissoziiert das Vorläuferion fast vollständig. Wird anschließend die relative Kollisionsenergie weiter erhöht, ist nur eine marginale Veränderung des MS/MS-Spektrums zu beobachten. Dieser Fragmentierungspunkt konnte für je mindestens acht Ladungszustände der acht 15-mere, fünf 24-mere, fünf 32-mere und fünf 40-mere erfasst werden, wobei jede Messung fünfmal wiederholt wurde. Vergleicht man die zur Dissoziation benötigte Schwellenenergie, ist ein gemeinsamer Trend erkennbar (Abbildung 11).

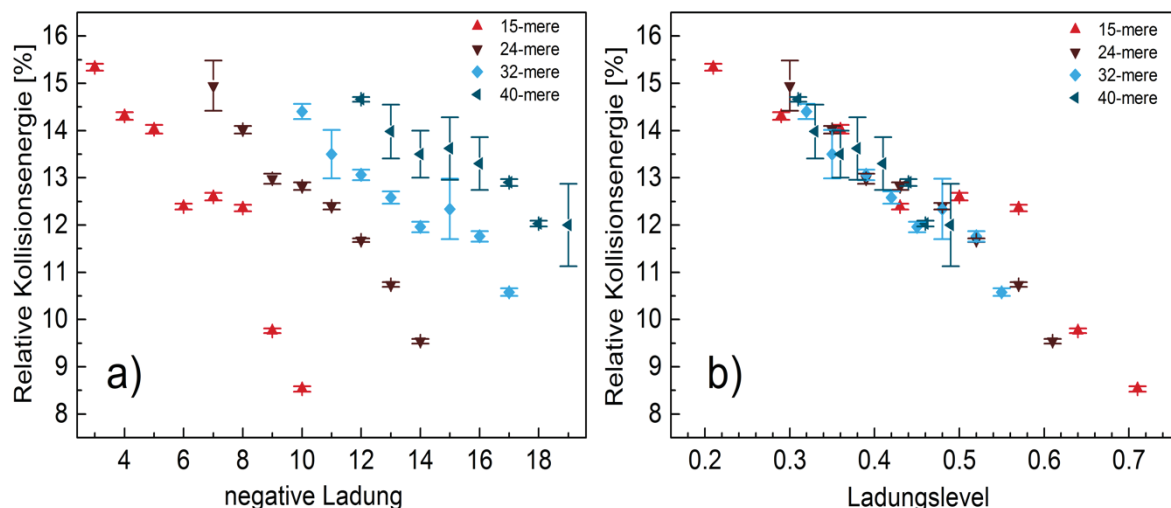


Abbildung 11. Korrelation zwischen der Ladung und der zur Fragmentierung nötigen Energie. a) Die über alle Sequenzen gemittelte Energie aufgetragen gegen den jeweiligen Ladungszustand. Mit zunehmender Ladung wird weniger Energie benötigt. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung ($N=5-8$) aller Messungen. b) Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Energie nochmals gegen das Ladungslevel aufgetragen. Unabhängig von Länge und Sequenz konnte ein ähnlicher Trend beobachtet werden.

Durch die lange Aktivierungszeit von 30 ms innerhalb der Ionenfalle kann sich die Energie über das ganze Molekülion verteilen. Ab einem bestimmten Schwellwert kommt es zur Dissoziation aller bei dieser Energie möglichen Pfade. Diese Schwellenenergie ist ein Maß für die Gesamtstabilität des Vorläuferions. Die Stabilität kann dabei durch eine Konformationsänderung erhöht werden bzw. erniedrigt sich die Stabilität bei zunehmender Ladung durch eine zunehmende Coulombabstoßung. Der Wert für die benötigte Schwellenenergie verschiebt sich mit zunehmendem Ladungslevel hin zu kleineren Beträgen. Das bedeutet, dass das zunehmende Ladungslevel das Molekülion dahingehend destabilisiert, dass wesentlich weniger Energie für die Dissoziation aufgebracht werden muss, als bei einem geringeren Ladungslevel von beispielsweise 0,2 für ein dreifach negativ geladenes 15-mer. Für die höchsten und die niedrigsten Ladungszustände konnte ein linearer Trend für die Abnahme der Energie bei steigenden Ladungen beobachtet werden, wobei die Steigung für alle Längen der Oligonukleotide vergleichbar war. Das 15-mer beispielsweise weist eine Kollisionsenergie zwischen 8,5 und 15,4 % auf, während das 40-mer zwischen 11,0 und 14,7 % relative Energie zur Fragmentierung benötigt. Längere Oligonukleotide können die Energie effektiver verteilen als kurze. Betrachtet man hingegen nur das Ladungslevel, sind alle Werte gut vergleichbar. Bei mittleren Ladungszuständen ist statt eines linearen Trends ein Sattelpunkt erkennbar, bei welchem trotz höherer Ladung fast die gleiche Schwellenenergie für die Dissoziation aufgewendet werden muss. Das gleiche Experiment wurde ebenfalls mit Gegenionen bis hin

zu einem vierfachen Natriumaddukt wiederholt, um einen Einfluss auszuschließen (Anhang Abbildung A2). Zusätzlich wurden die für Dissoziation nötigen Energien von 15-meren, welche ausschließlich Purin- bzw. Pyrimidinbasen trugen, im Vergleich zu gemischten 15-meren bestimmt (Anhang Abbildung A3). Die für die kollisionsinduzierte Dissoziation relevanten Faktoren scheinen nur die Ladung sowie die Größe zu sein, mit anderen Worten die Ladung pro Phosphat bzw. das Ladungslevel. Am Sattelpunkt führt eine weitere Ladung zunächst nicht zu einer weiteren Destabilisierung des Ions. Da Länge und Ladung definiert sind, kann nur eine Konformationsänderung eine weitere Stabilisierung ermöglichen. Der Sattelpunkt für alle Oligonukleotide liegt nahe einem Ladungslevel von 0,5, genauer gesagt für die 15-meren bei 0,49, für die 24-meren bei 0,43, für die 32-meren bei 0,49 und für die 40-meren bei 0,39. Dieses mittlere Ladungslevel stimmt außerdem mit dem Ladungsniveau überein, ab dem ein Wechsel von neutralem hin zu einem negativen Basenverlust beobachtet wurde. Eine plausible Erklärung für das beobachtete Verhalten ist eine ladungsgetriebene strukturelle Destabilisierung, die eine Konformationsänderung induziert, welche zur Ausbildung des Sattelpunktes führt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden IM-MS Versuche durchgeführt. Für Oligonukleotide aller Größen und jeweils aller Ladungszustände wurden von daher die rotationsgemittelten Stoßquerschnitte (CCS) ermittelt. Abbildung 12 zeigt eine Auftragung der CCSs gegen das Ladungslevel der Ionen. Das ermöglichte einen direkten Vergleich aller Längen. Generell zeigte sich eine Vergrößerung der CCSs mit steigendem Ladungsniveau.

Diese Korrelation zeigt direkt einen Zusammenhang zwischen der Coulombabstoßung und einer Konformationsänderung. Mit zunehmender Ladung und somit zunehmenden Bestreben gleiche Ladungen voneinander zu entfernen, kann hierbei eine Entfaltung ermittelt werden. Es ist jedoch eine leichte Verschiebung der Auffaltungsregion in Bezug auf das Ladungslevel im Vergleich zum Sattelpunkt festzustellen. Diese Abweichung kann durch die Verwendung verschiedener Massenspektrometer erklärt werden. Es wurde bereits gezeigt, dass eine zusätzliche Erwärmung von Ionen im verwendeten IMS-Gerät auftreten kann, was ein Grund für die beobachteten experimentellen Unterschiede sein könnte.(137-140) Um auch hier eine Sequenzabhängigkeit auszuschließen, wurden wiederum verschiedene Sequenzen für verschieden Längen analysiert (Abbildung 12).

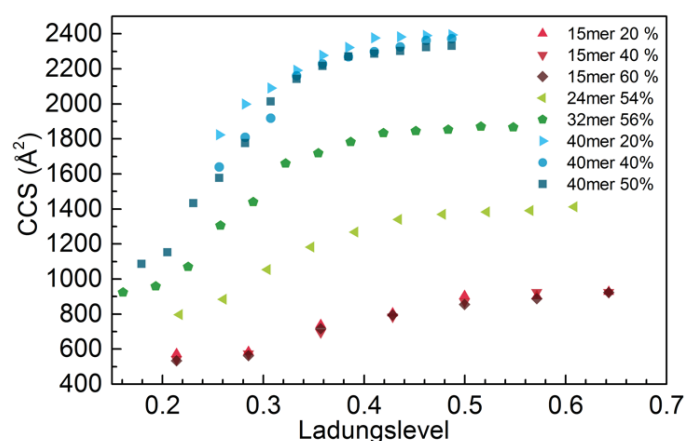


Abbildung 12. Korrelation der CCS in Bezug auf das Ladungslevel von drei 15-meren (20, 40 und 60 % GC-Anteil), einem 24-mer (54 % GC-Anteil), einem 32-mer (56 % GC-Anteil) und drei 40-meren (20, 40 und 50 % GC-Anteil)

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der Trend der IM-MS-Experimente eine gute Übereinstimmung mit den CID-Experimenten aufweist. Es kann bei den höchsten als auch bei den niedrigsten Ladungszuständen eine stabile Konformation gezeigt werden. Im mittleren Ladungsbereich wurde jedoch eine Zunahme der CCSs mit steigender Ladung festgestellt, welche auf eine Auffaltung des Strangs hindeutet. Die Ähnlichkeit zu den CID-Experimenten und den gezeigten Basenverlusten bestätigt die Konformationsänderung, welche in der linearen Ionenfalle aufgrund des Sattelpunktes untersucht werden konnte. Die Entfaltung des Stranges ermöglicht eine Kompensation der erhöhten Energiezugabe trotz steigender Ladung bis hin zur einer vollständigen Entfaltung. Es wurden für mittlere Ladungszustände ähnliche Kollisionsenergien benötigt, um eine Fragmentierung zu erreichen. Unterschiedliche Stabilisierungskräfte, wie Wasserstoffbrücken, zwitterionische Kräfte, π -Stapelung der Aromaten oder Van-der-Waals-Kräfte können dabei eine Rolle spielen. Anschließend verläuft der Trend wieder linear mit gleichbleibender Steigung bei zunehmender Ladung. Bei einem Ladungsniveau von 0,5, bei dem jedes zweite Phosphat eine Ladung trägt, spielt aber nicht nur die strukturelle Flexibilität der Ionen, sondern auch die energetisch günstigste Geometrie eine zunehmende Rolle. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein Oligonukleotid mit wenigen negativen Ladungen im Vergleich zu einem stark geladenen Ion weniger interne Coulombabstoßung erfährt und daher eine gefaltete, kompakte Form aufrechterhalten kann, während ein höher geladener Strang die Ladung entlang eines größeren Raums verteilen muss, was zu einer länglichen, aufgefalteten Struktur führt.

3.1.2. Ladungsabhängiges Verhalten von LNA-Strängen

Die ladungsgetriebene geometrische Reorganisation wurde anschliessend bei LNA-Einzelsträngen überprüft. LNA weist aufgrund der zusätzlichen Verbrückung in der Ribose eine geringere Flexibilität als ein vergleichbarer DNA Strang auf, da eine RNA ähnliche C3'-endo Konformation fixiert ist. Infolgedessen konnte eine höhere Stabilität durch die Reduzierung der Freiheitsgrade bei der Bildung von Doppelsträngen mit DNA im Vergleich zu DNA/DNA Doppelsträngen nachgewiesen werden.⁽¹³²⁾ Auch für die folgenden Versuche wurden 15-mer Einzelstränge genutzt. Insgesamt wurde vier verschiedene Stränge und der jeweilige DNA-Strang gleicher Sequenz untersucht. Zunächst konnte festgestellt werden, dass die erzeugte Ladungsserie der LNA der DNA sehr ähnlich ist, mit dem Unterschied, dass das dreifach negativ geladenen Ionen nicht detektiert werden konnte (Abbildung 13 a/b). Weiterhin unterschieden sich die erzeugten CID-Spektren in der Art der Fragmente (siehe Kapitel 3.2.3), jedoch war der gleiche scharfe Fragmentierungspunkt bei einer Änderung der relativen Kollisionsenergie um jeweils 0,1 % zu erkennen (Abbildung 13 c/d).

Dieser Fragmentierungspunkt konnte, wie auch für die DNA, für alle Ladungszustände bestimmt werden. Außerdem änderten sich die CID-Spektren, wie auch zuvor bei einer weiteren Erhöhung der Energie, nur noch sehr wenig. Vergleicht man die zur Fragmentierung benötigten Energien der einzelnen Ladungszustände mit denen der DNA-Stränge, fallen jedoch Unterschiede auf. Am Beispiel des 15-mers 5'-GGC TAA CGC ATA GGC-3' sollen diese nun näher erläutert werden (alle weiteren im Anhang Abbildung A4). Zum einen wird für die Dissoziation der LNA mehr Energie als bei DNA der gleichen Sequenz benötigt. Bis auf den Ladungszustand 9-, für welchen 1,0 % weniger Energie nötig ist, werden zwischen 1,3 und 3,1 % mehr Energie bis zum Fragmentierungspunkt benötigt (Abbildung 14 links). Zwar besitzt die LNA weniger Freiheitsgrade als die DNA und somit weniger Möglichkeiten die eingebrachte Energie zu verteilen, bis es zu einer Dissoziation kommen kann, jedoch weist die LNA auch ein verändertes Fragmentierungsmuster auf.

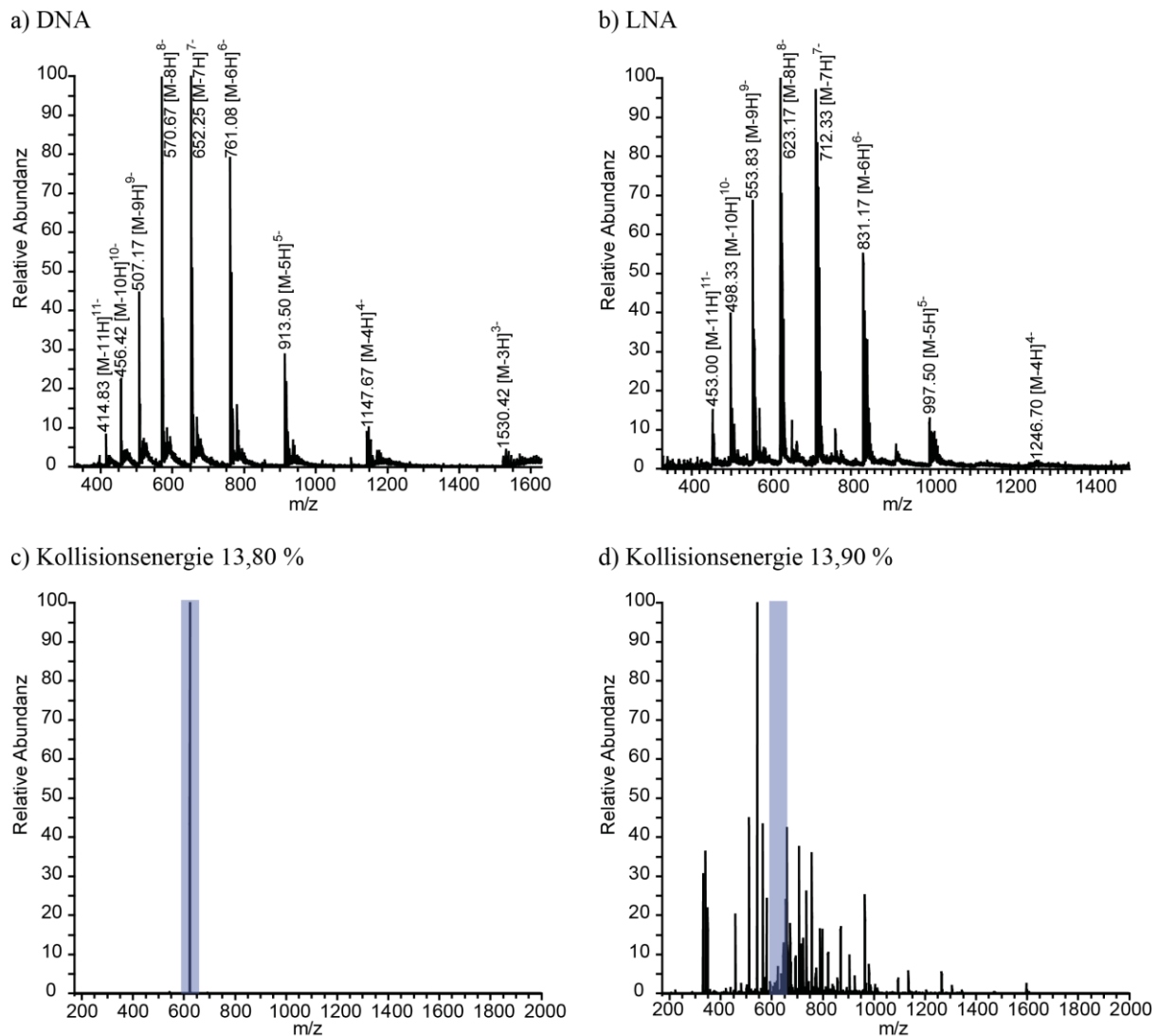


Abbildung 13. ESI-MS und ESI-MS/MS Spektren. a) Ladungsspektrum des DNA 15-mers 5'-AAA TTA TAA TTA TAT-3' b) Ladungsspektrum des LNA 15-mers 5'-AAA TTA TAA TTA TAT-3' c) Tandem-MS/MS-Spektrum des Vorläuferions m/z 623,17 [M-7H]⁷⁻ (blau markiert) bei einer relativen Kollisionsenergie von 13,80 %. d) MS/MS-Spektrum des Vorläuferions m/z 623,17 [M-7H]⁷⁻ (blau unterlegt) bei einer relativen Kollisionsenergie von 13,9 %.

Diese Veränderung kann dadurch erklärt werden, dass die Mechanismen der Fragmentierung für ein weniger bewegliches Ion mehr Energie benötigen, um eine weniger günstige Sterik zu überwinden. Bei DNA-Strängen ist der dominante Dissoziationsweg der Basenverlust, dieser ist jedoch durch die sterische Fixierung gehemmt, bzw. ist die Gasphasenstruktur stabiler, wodurch folglich mehr Energie eingebracht werden muss, um eine Dissoziation zu erreichen.(132)

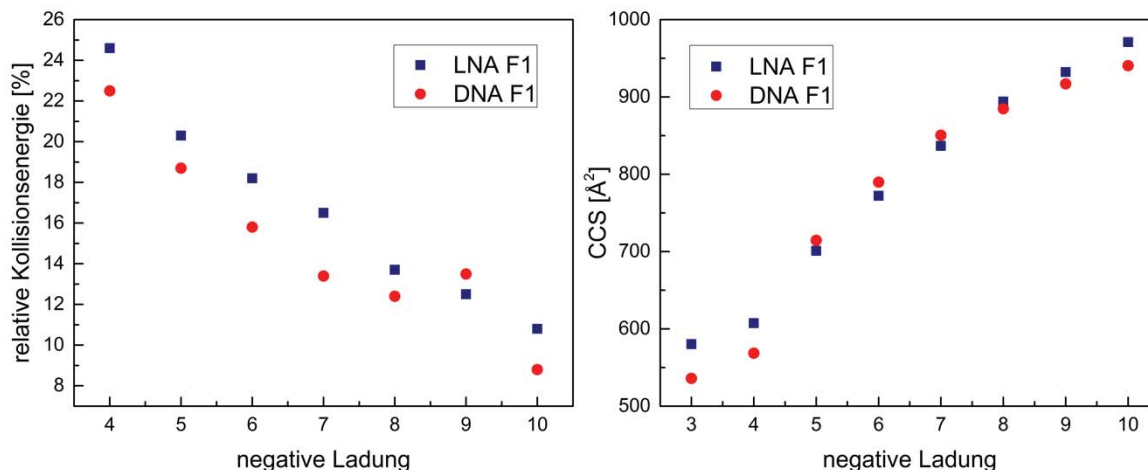


Abbildung 14. Links) Korrelation zwischen der Ladung und der zur Fragmentierung nötigen Energie des DNA- bzw. LNA-Einzelstrangs 5'-GGC TAA CGC ATA GGC-3'. Rechts) Korrelation der CCSs in Bezug auf das Ladungslevel des DNA- bzw. LNA-Einzelstrangs 5'-GGC TAA CGC ATA GGC-3'.

Im Gegensatz zur DNA ist kein Sattelpunkt auszumachen. Stattdessen war der Verlauf fast linear. Als Ursache kann die mangelnde Flexibilität ausgemacht werden. Diese war auch deutlich erkennbar, wenn man die CCSs aller Ladungszustände im Vergleich zur DNA betrachtet (Abbildung 14 rechts). DNA weist kleinere CCSs bei geringen Ladungszuständen auf, welche sich linear mit steigender Ladung vergrößern. Bei mittleren Ladungszuständen war eine Auffaltung erkennbar, bis sich die CCSs bei einem bestimmten Ladungslevel nicht mehr änderten, da eine vollständige Auffaltung stattgefunden hatte (siehe Kapitel 3.1.1). Im Bereich geringer Ladungsniveaus (3- und 4-) konnte man im Vergleich bei allen LNA-Strängen deutlich höhere CCSs feststellen, da eine so kompakte Faltung, wie die der DNA, nicht möglich zu sein scheint. Des Weiteren war auch hier ein annähernd linearer Verlauf zu erkennen, was wie auch bei den Fragmentierungspunkten darauf hinweist, dass aufgrund der sterischen Hinderung, die eingebrachte Energie nicht in einer Konformationsänderung münden kann, sondern direkt zur Fragmentierung genutzt wurde. Insgesamt kann festgehalten werden, dass sich LNA sowohl in seiner Konformation, als auch in seinem Fragmentierungsverhalten bezüglich Energieaufwand und Fragmentidentität, stark von DNA unterscheidet. Dieses Phänomen war mittels IM-MS auch bei Doppelsträngen zu beobachten. Im Vergleich der CCS der DNA Doppelstränge A, C, F und H (Sequenzen siehe Tabelle A1) ist zunächst zu beobachten, dass Stränge mit einem hohen AT Anteil auch größere CCS aufweisen (Strang A 878,67 Å², C 881,33 Å², beide [M-5H]⁵⁺). Bei Doppelsträngen mit hohem GC Anteil hingegen scheint jedoch eine kompaktere Struktur vorzuliegen, was sich in kleineren CCS äußert (Strang

F 857.77 Å², H 857,39 Å², beide [M-5H]⁵⁻). Vergleich man nun beispielsweise den DNA Strang F mit einem GC Anteil von 60 % mit dem Hybrid Doppelstrang der gleichen Sequenz, fällt die deutlich höhere CCS auf (LNA-DNA Doppelstrang 922,89 Å², [M-5H]⁵⁻). Somit ist auch innerhalb der Doppelstränge die sterische Hinderung entscheidend für die Zusammenfaltung und von daher auch für den größeren Wirkungsquerschnitt. Bei den Einzelsträngen betrug der Unterschied, außer bei niedrigem Ladungslevel (~40 Å²), etwa 10-30 Å², während beim Doppelstrang-Hybrid schon ein Unterschied von ~65 Å² vorlag.

Mittels des durch CID ermittelten Fragmentierungspunktes, sowie den IM-MS Analysen der verschiedenen Ladungszustände von LNA, konnte ein deutlich anderes Verhalten von LNA im Vergleich zu DNA in der Gasphase gezeigt werden. Aufgrund der starren Struktur von LNA und der damit einhergehenden Hemmung des in DNA bevorzugten Fragmentierungsweges wurde mehr Energie zur Fragmentierung benötigt. Außerdem wurden für LNA höhere CCS für Einzel- und Doppelstränge ermittelt, da diese eine weniger kompakte Struktur als DNA einnimmt.

3.2. Kollisionsinduzierte Dissoziation von Einzel- und Doppelsträngen

3.2.1. 4-mere im Vergleich zwischen CID und HCD

Nachdem im vorherigen Kapitel allgemein auf die Gasphasenstruktur von Einzel- und Doppelsträngen in Beziehung zu ihrer Ladung, Länge und Sequenz eingegangen wurde, sollen nun verschiedene MS/MS-Techniken näher betrachtet werden. Nachdem die HCD-Technik kommerziell erhältlich war, wurden viele Vergleichsstudien bezüglich CID durchgeführt.(141-144) Zumeist wurden jedoch lediglich Peptide oder auch Modifikationen an solchen untersucht. Gerade Proteine bzw. Peptide generieren jedoch recht einfache MS/MS-Spektren mit nur wenigen Fragmenten. Die Unterschiede in solchen Studien waren daher eher marginal. Zumeist wurden als hauptsächliche Unterschiede die Möglichkeit der Hochauflösung und des nicht vorhandenen *Low-Mass-Cutoff* diskutiert.(11, 37) Aus diesem Grund werden in der täglichen Laborroutine beide Techniken oft gleichgesetzt. CID-Experimente an DNA wurden bereits ausführlich analysiert, HCD wurde bislang jedoch noch nicht angewendet.(38, 39) Hier soll nun der Unterschied zwischen einer kompetitiven (CID) und einer konsekutiven (HCD) Fragmentierung gezeigt werden. Um das Fragmentierungsverhalten von Oligonukleotiden in HCD und CID zu untersuchen, wurden insgesamt zwölf 4-mere mit unterschiedlichen Sequenzen gemessen. Dabei wurde die Kollisionsenergie so angepasst, dass das Vorläuferion gerade vollständig dissoziierte. Schon ohne alle Fragmentidentitäten zu berücksichtigen, konnte bei einem direkten Vergleich der Intensitäten der dominantesten Fragmente ein deutlicher Unterschied beim Variieren der Energie beobachtet werden (Abbildung 15). Während bei CID (wie in Kapitel 3.1 beschrieben) ein Fragmentierungspunkt beobachtet wurde, ab welchem sich das Spektrum auch beim Erhöhen der Kollisionsenergie nicht mehr

signifikant änderte, so konnte dies in HCD nicht bemerkt werden. Stattdessen war mit steigender Energie ein langsamer An- und Abstieg einzelner Fragmentintensitäten zu erkennen.

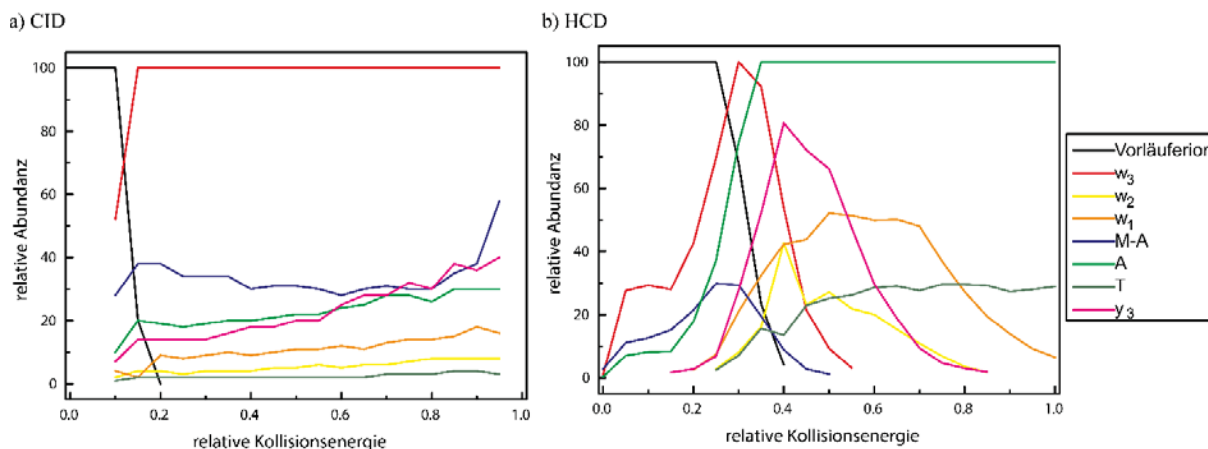


Abbildung 15. Vergleich des Verhaltens von einem 4-mer Oligonukleotid in CID und HCD. a) Relative Intensitäten der dominanten Fragmente des 4-mers 5'-ACTG-3' im Ladungszustand 3- in Korrelation zur relativen Kollisionsenergie in CID. b) Relative Intensitäten der dominanten Fragmente des 4-mers 5'-ACTG-3' im Ladungszustand 3- in Abhängigkeit der relativen Kollisionsenergie in HCD. Die Aktivierungsenergie wurde in Schritten von 5 % verändert.

Zum weiteren Vergleich wurden anschließend alle Spektren für insgesamt drei Ladungszustände der zwölf 4-mere verglichen. Im Gegensatz zu Biomolekülen, wie Peptide, welche wenigen Fragmentierungswegen folgen, sind bei Oligonukleotiden mit ihrer hohen Anzahl sich bildender Fragmente völlig andersartige Spektren generiert worden. Für alle 4-mere konnte ein sehr ähnliches Verhalten beobachtet werden. Als Beispiel soll von daher hier nur das 4-mer 5'-ACTG-3' näher beschrieben werden (Abbildung 16).

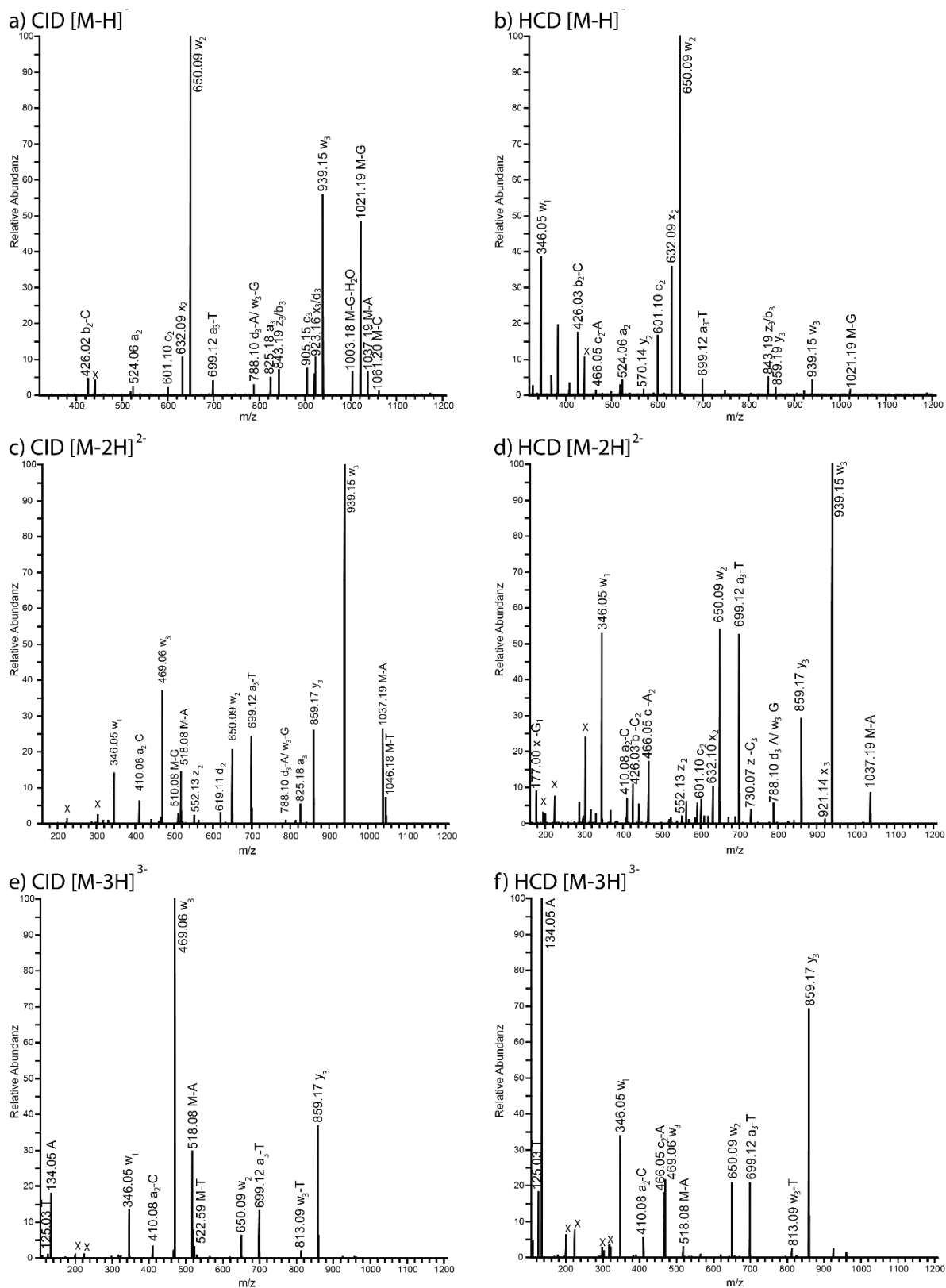


Abbildung 16. ESI-MS/MS-Spektren des 4-mers 5'-ACTG-3'. Links) CID Spektren der Ladungszustände 1- (a), 2- (c) und 3- (e), rechts) HCD Spektren der Ladungszustände 1- (b), 2- (d) und 3- (f).

Wie bereits früher beschrieben, ist die Bildung der Fragmente auch ladungsabhängig, daher wurden alle drei Ladungszustände näher betrachtet.^(38, 111) Der direkte Vergleich von HCD

und CID weist erhebliche Unterschiede im Fragmentierungsverhalten auf. Die Fragmente unterscheiden sich dabei sowohl qualitativ, als auch in ihrer Intensität. Die absolute Anzahl der Fragmente ist jeweils sehr ähnlich, jedoch ist die Identität, d.h. die Stelle an der der Bindungsbruch auftritt, unterschiedlich. Die CID-Experimente von 5'-ACTG-3' von allen drei Ladungszuständen resultierten in 14 Fragmenten, welche in HCD nicht erzeugt wurden. Umgekehrt traten zwölf Fragmente ausschließlich in HCD auf. Sechs der 14 exklusiven CID-Fragmente waren $[M-H_xB]^x$ -Fragmente, während sechs der zwölf exklusiven HCD-Fragmente durch einen Rückgratbruch mit Basenverlust der Art $[c_2-A]^-$ auftraten. Schon hier spiegeln sich die zwei unterschiedlichen Modelle des konkurrierenden und des aufeinander folgenden Kollisionsmodells wider, infolgedessen die Stabilität der Produkte bzw. Zwischenprodukte voneinander abweichen. Diese Trends sind konsistent für alle untersuchten 4-mere, unabhängig von der Sequenz. Im Allgemeinen ist zu bemerken, dass der negative Basenverlust in HCD stark bevorzugt auftritt. Zum Beispiel konnte als abundantestes Signal im HCD-Fragmentspektrum des dreifach negativ geladenen 5'-ACTG-3', ein negativ geladenes Adenin gefunden werden, während es in CID-Experimente nur eine geringe Intensität aufwies. Auch das dominante Signal des w_1 -Fragmentes zeigte immer eine höhere Intensität in HCD, jedoch ist dieser Trend umgekehrt für w_3 , während sich die Intensitäten des w_2 in beiden Methoden die Waage hielten. Auch $[M-H_x-B]^x$ -Fragmente wurden in allen Spektren nachgewiesen. In CID waren diese nicht nur äußerst intensiv, sondern auch verschiedenen Ladungszuständen bzw. auch von verschiedenen Basen vorhanden, während beim HCD-Prozess nur sehr wenige Fragmente dieser Art und nur mit einer schwachen Intensität erzeugt wurden. Im Gegensatz dazu wurden in der HCD 14 von 15 Rückgratbrüchen mit Basenverlust der Art $[c_2-A]^-$ mit einer höheren Intensität als in CID verzeichnet. In ähnlicher Weise stellt y_3 ein interessantes Fragment dar, welches in allen Ladungszuständen in einer hohen Abundanz auftrat. Jedoch konnte auch dieses intensiver im HCD beobachtet werden. Für einen direkten Vergleich aller signifikanter Fragmentierungskanäle im Ladungszustand 1- aller zwölf 4-mere wurde ein sogenannter Heatmap erstellt (Abbildung 17).

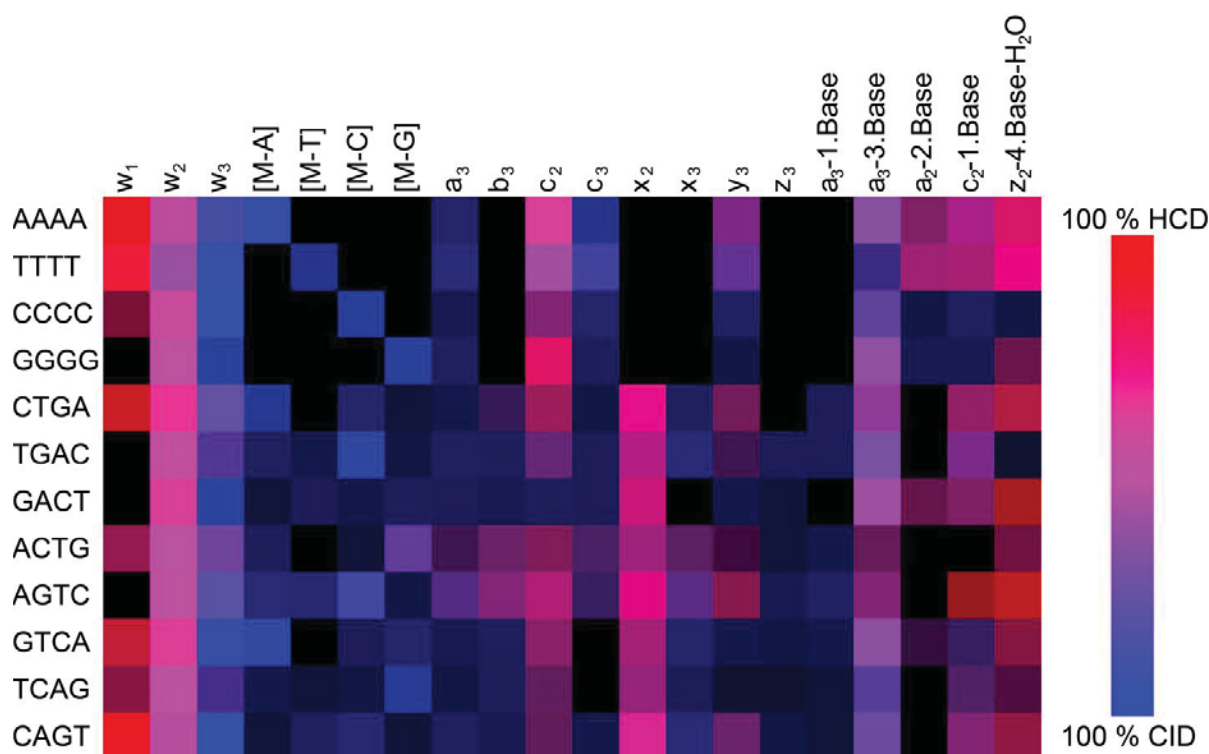


Abbildung 17. Relative Intensitäten für alle dominanten Fragmente aller zwölf 4-mere der einfach negativ geladenen Vorläuferionen. Die Intensitäten in CID wurden blau, die in HCD in rot dargestellt. Mischfarben bezeichnen Fragmente, welche in beiden Experimente auftraten. Schwarze Felder zeigen das Fehlen des entsprechenden Fragmentes an.

Mit Hilfe dieser farbigen Darstellung können die Unterschiede beider Methoden auf einen Blick erfasst werden. Die relativen Häufigkeiten der dominantesten Fragmente (ab einer Intensität von 5 %) wurden hier für CID blau und für HCD rot unterlegt, Überlappungen sind in lila Tönen dargestellt. Je intensiver dabei die Farbe, desto abundanter konnte das Fragmentensignal erfasst werden. Insgesamt wurden hier 20 verschiedene Fragmente von den zwölf verschiedenen 4-meren zusammengefasst. Überraschenderweise sind rein blaue und rein rote Farbtöne stärker vertreten, als Mischfarben. Mit anderen Worten, in der Mehrheit der Fragmentierungskanäle gibt es eine ausgeprägte Selektivität in CID bzw. in HCD. Der wohl markanteste Unterschied liegt in den Fragmenten mit neutralen Basenverlust. Diese einfache Fragmentierung stellt in CID die am häufigsten vorkommende Fragmentspezies dar, während diese Gruppe in HCD nur von geringer Intensität war oder gar nicht auftrat. In Anbetracht der Einzelkollisionsmethode in CID scheint dieser Reaktionskanal der bevorzugte erste Dissoziationsschritt zu sein. In CID-Experimenten, bei welchen die Energie der Vorläuferionen in der Ionenfalle in sehr kleinen Schritten erhöht wurde, konnte diese Fragmentgruppe auch immer als erstes Fragment beobachtet werden (Anhang, Abbildung A5). Dies zeigt, dass der Basenverlust in einer einstufigen (kompetitiven) Dissoziation kinetisch begünstigt wird.

Entsprechend der Klassifikation von HCD als überwiegend konsekutiver Prozess werden diese Fragmente in Multi-Kollisionsprozesse weiter angeregt und fragmentiert zu Fragmenten der zweiten Generation. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass [M-B]-Fragmente in HCD nur von äußerst geringer Intensität generiert wurden, bzw. in den meisten Fällen nicht nachgewiesen werden konnten. Während dieser Kanal einem klaren Trend folgte, welcher leicht zu erklären ist, sind die Unterschiede der anderen Spezies komplexer. Trotzdem können für alle Fragmentklassen ähnliche Aussagen getroffen werden. Bei einfachen Strangbrüchen streuten die Intensitäten verschiedener Fragmente für beide Techniken und zeigen keine klare Präferenz für eine Gruppe. Fragmente wie [a₃-B] entstanden zwar mit beiden Techniken, jedoch lieferte eine Technik immer eine höhere Intensität im Vergleich zur jeweils anderen. Dasselbe Verhalten konnte für das kombinierte Produkt aus einem Strangbruch mit einem Basenverlust beobachtet werden. Einzelne Fragmente bzw. in einigen Strängen konnten zwar deutlich unterschiedliche Abundanzen festgestellt werden, jedoch war kein Trend erkennbar. Im Allgemeinen scheint diese Fragmentgruppe weniger spezifisch zu sein, als beispielsweise [M-B] oder negativ geladenen Basen. Auch w-Fragmente zeigten hier eine deutliche Selektivität. Während w₁ immer bevorzugt in HCD gebildet wird, dreht sich dieser Trend bei w₃ um, während w₂ in CID sowie in HCD fast gleich stark ausgeprägt wird. Basierend auf den einfachen Modellen des kompetitiven und des konsekutiven Zerfalls scheint der w₁-Kanal überwiegend über eine konsekutive Fragmentierung aufzutreten. Dies macht w₁ zu einem Produkt, das auch in einem thermisch angeregten Prozess bevorzugt werden würde. In diesem Fall wäre w₃ nur ein Zwischenprodukt. Die Komplexität dieses Systems macht es jedoch sehr schwierig, alle individuellen Dissoziationskanäle in diese beiden Kategorien einzuordnen. Einige Kanäle, wie der einfache Basenverlust, könnten jedoch zur Voraussage von Fragmentklassen in CID und HCD genutzt werden. Die Heatmap ermöglicht eine zusammengefasste visuelle Analyse der dominanten Fragmentierungen. Daher wurden ebenfalls für das zweifach und dreifach negativ geladenen Vorläuferion eine solche Heatmap erstellt (Abbildung 18). Die individuellen Korrelationen für diese beiden Ladungszustände sollen hier nicht im Detail diskutiert werden, da sie vergleichbare Ergebnisse zum einfach negativ geladenen Ion liefern.

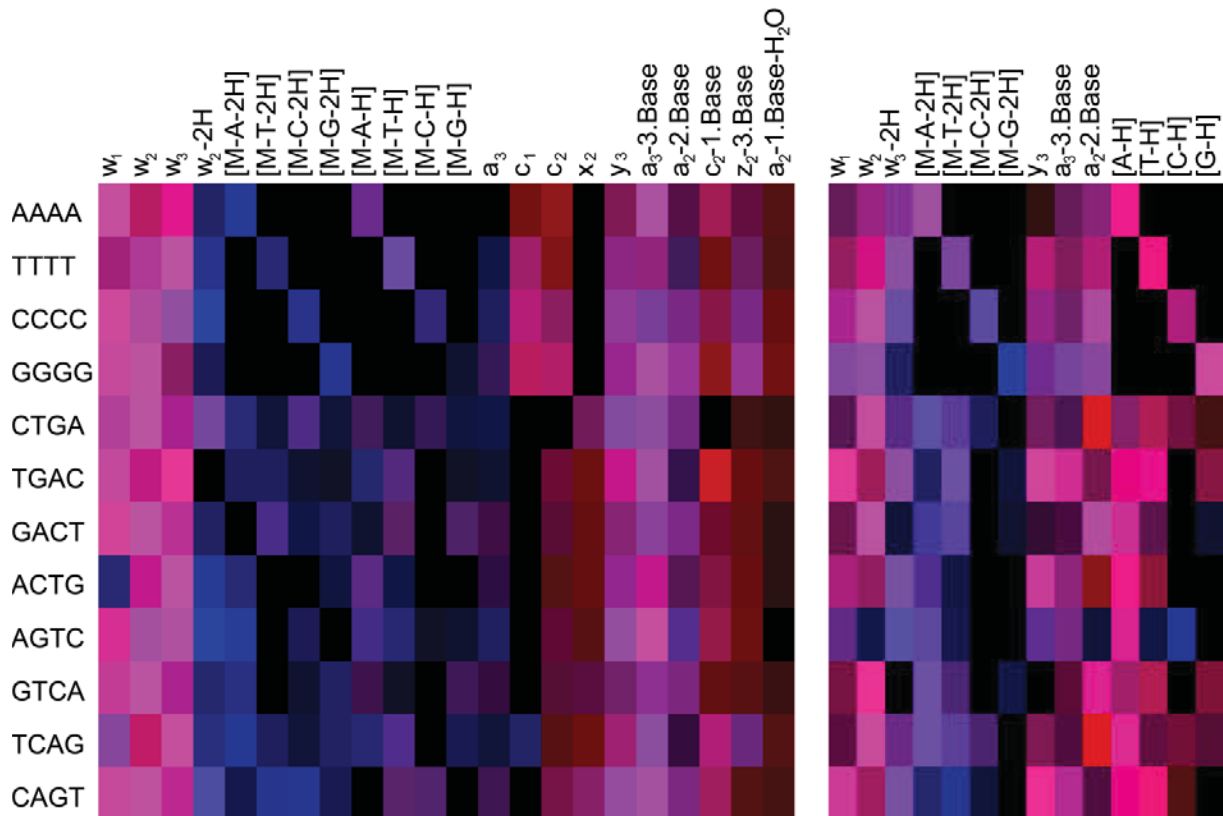


Abbildung 18. Relative Intensitäten für alle dominanten Fragmente der Vorläuferionen des Ladungszustandes 2- (links) und 3- (rechts) aller zwölf 4-mere. Die Intensitäten in CID wurden blau, die in HCD in rot dargestellt. Mischfarben bezeichnen Fragmente, welche in beiden Experimente auftraten. Schwarze Felder zeigen das Fehlen des entsprechenden Fragmentes an.

Die generellen Trends können auch hier erkannt werden, so tritt beispielsweise erneut eine starke Kollisionsspezifität für einfache Basenverluste auf. Auch die Abspaltung negativ geladener Nukleobasen in HCD ist stark abundant, während w-Fragmente hier keinem deutlichen Trend folgen.

Die Darstellung als Heatmap ermöglicht eine direkte visuelle Überprüfung, die qualitativ sofort Ähnlichkeiten, sowie Trends in Ladungszuständen, anzeigen kann. Die gravierenden Unterschiede beider MS/MS-Techniken in der Art und der Intensität der Fragmente zeigten eine Möglichkeit der orthogonalen Nutzung von CID und HCD auf. Der Vergleich an Oligonukleotiden machte hier eine experimentelle Charakterisierung der einzelnen Produkte in Bezug auf ihre Stabilität und der Bildung der nächsten Fragmentgeneration im Falle der konsekutiven Dissoziation möglich. Die Ergebnisse verdeutlichen die Rolle von Übergangsintermediaten in komplexen Fragmentierungsreaktionen und können helfen, Dissoziationsmechanismen vorherzusagen oder zu beweisen. Dieses kann erreicht werden, indem Fragmente identifiziert werden, die nur in CID Experimenten stabil sind und somit als direkte Nachkommen der Vorläuferionen betrachtet werden können. Die hier verwendeten

Oligonukleotide erwiesen sich aufgrund ihrer vielfältigen Fragmentbildung als empfindliche Sonden für feine Veränderungen der Fragmentierungsmuster.

3.2.2. CID Experimente an Doppelstrang-DNA

Das Fragmentierungsverhalten bzw. die Identität der Fragmente von Einzelstrang-Oligonukleotiden in Bezug auf Ladung und Sequenz in CID-Experimenten wurde, wie bereits erwähnt, in der Vergangenheit bereits ausführlich diskutiert.(111, 134-136) Jedoch gibt es nur wenige Studien zum Verhalten von Doppelsträngen.(116, 117, 119, 121) Gerade der Erhalt der nicht-kovalenten Bindung beim Übergang von der flüssigen in die Gasphase kann problematisch sein. Je kürzer die einzelnen Stränge sind oder auch je geringer der GC-Anteil, desto wahrscheinlicher wird eine Separierung der beiden Einzelstränge im MS. In der Vergangenheit wurden in MS/MS-Experimenten von Doppelsträngen beispielsweise der Einfluss der Ladung untersucht. Die Spektren verschiedener Ladungszustände eines Stranges können sich dabei, wie auch bei Einzelsträngen, sehr deutlich voneinander unterscheiden. Dabei fällt auf, dass das in Kapitel 3.1 eingeführte Ladungslevel einen großen Einfluss auf die Fragmentidentität und auch auf deren Intensität zu haben scheint. Gabelica *et al.* verglichen die CID-Spektren von vier verschiedenen Ladungszuständen eines 16-mer Doppelstrangs. In den Zuständen 8-, 7- und 6- konnte ausschließlich eine Einzelstrangseparierung erkannt werden. Beim Ladungszustand 5-, also bei einem niedrigeren Ladungslevel, jedoch fanden multiple Strangbrüche statt.(116, 117, 119, 121) Zum Vergleich sollen hier drei Ladungszustände eines 8-mer Doppelstrangs betrachtet werden. Im Gegensatz zu den erwähnten Studien, zeigte jeder der drei Ladungszustände ein deutlich anderes Fragmentierungsverhalten (Abbildung 19).

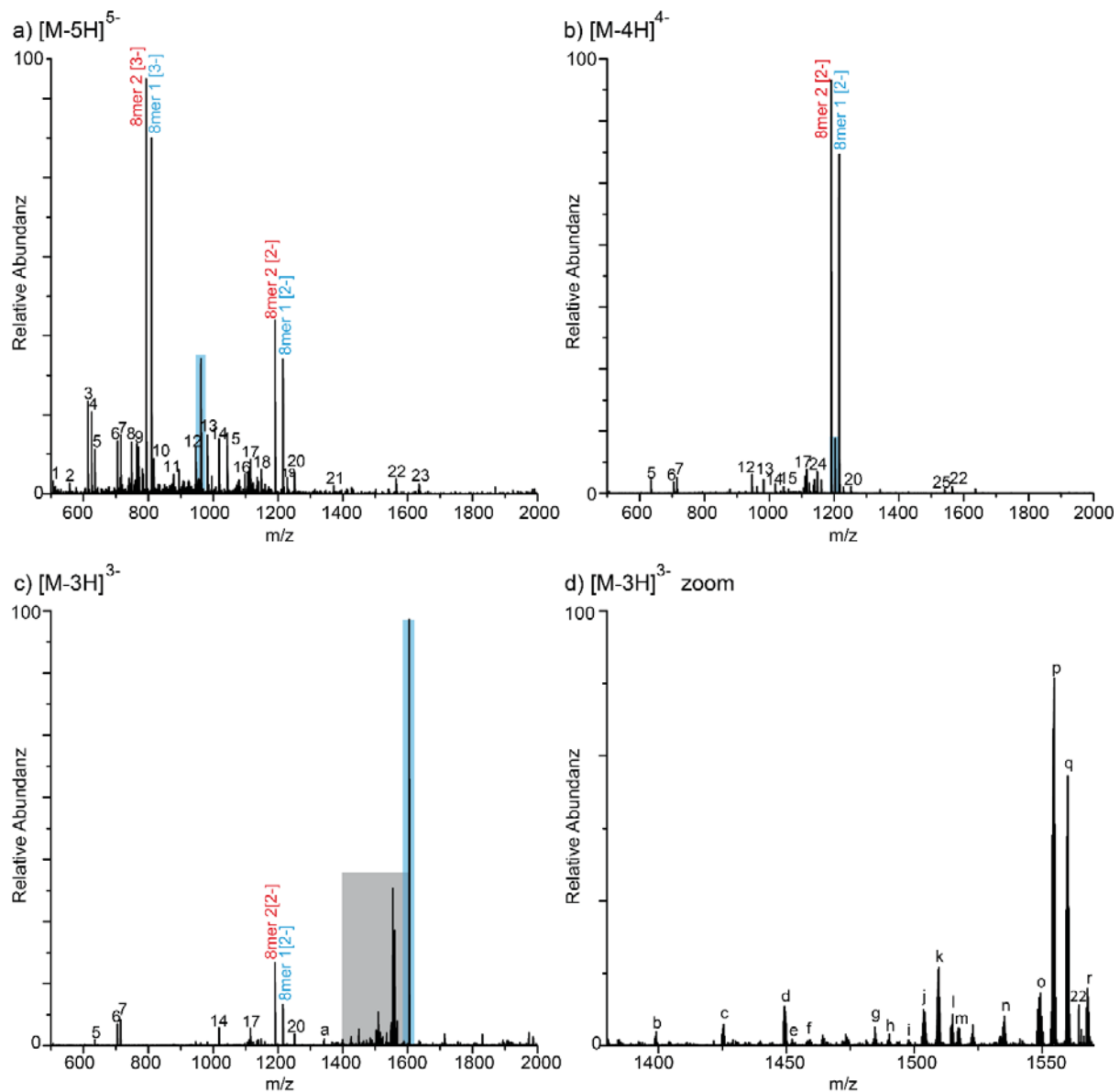


Abbildung 19. ESI-MS/MS-Spektren eines 8-mer Doppelstrangs in CID-Experimenten. a) CID-Spektrum des fünffach negativ geladenen Doppelstrangs. b) CID-Spektrum des vierfach negativ geladenen Doppelstrangs. c) CID-Spektrum des dreifach negativ geladenen Doppelstrangs. d) CID-Spektrum des vierfach negativ geladenen Doppelstrangs mit einer Vergrößerung des Bereichs von ca. m/z 1400-1550. Das Vorläuferion ist blau unterlegt, die Signale der kompletten Einzelstränge sind blau und rot hervorgehoben, der graue Bereich in c) wurde in d) vergrößert. Zahlen bezeichnen Fragmente der Einzelstränge, Buchstaben Fragmente des Doppelstrangs. Eine ausführliche Zuordnung ist in Tabelle A2 zu finden.

Im Spektrum des Ladungszustandes 5-, also im höchsten beobachteten Ladungslevel, ist eine deutliche Separierung der Einzelstränge zu erkennen. Diese erfolgt auch durch den Einfluss der Coulombabstoßung, d.h. je höher das Ladungslevel, desto größer das Bestreben, in Einzelstränge zu zerfallen. (86, 121, 145) Im Spektrum waren hierbei die intensivsten Signale die der beiden Einzelstränge, jeweils in den Ladungszuständen 2- und 3-.. Die Verteilung der

Ladung auf beide Stränge scheint dabei recht gleichmäßig zu sein. Weiterhin sind in diesem Spektrum ausschließlich Fragmente der Einzelstränge zu erkennen. Es kann hier also nur ein einfacher Bruch der kovalenten Bindung nachgewiesen werden. Das Bestreben zunächst die nicht-kovalente Bindung aufzubrechen, ist hier wesentlich stärker, als die zur Fragmentierung. Deutlich wird dies auch am CID-Spektrum des Ladungszustandes 4-. Fragmente der Einzelstränge konnten zwar beobachtet werden, jedoch sind diese nur von geringer Intensität. Die zwei Einzelstränge können im Ladungszustand 2- mit hoher Intensität nachgewiesen werden. Die Ladungsverteilung war wieder sehr gleichmäßig. Andere theoretisch mögliche Ladungen, wie 3- oder 1-, konnten nicht nachgewiesen werden. Das CID-Spektrum des Doppelstrangs im Ladungszustandes 3- unterschied sich grundlegend von den anderen beiden. Bei Erhöhung der Kollisionsenergie entstanden zu allererst Doppelstrangfragmente, welche durch eine teilweise Denaturierung an den Enden der Doppelstränge mit anschließendem kovalenten Bindungsbruch entstehen.(121, 145) Es kam hierbei zu der Bildung einer Vielzahl von Doppelstrangfragmenten, bei denen nur jeweils kleine Stücke, wie eine Base, verloren wurden. Signale der Einzelstränge und deren Fragmente konnten ebenfalls beobachtet werden. Die Intensitäten dieser Signale stiegen mit Erhöhung der Kollisionsenergie. Um diese Energieabhängigkeit näher zu untersuchen, wurde ein 15-mer Doppelstrang untersucht, wobei die relative Kollisionsenergie in 5 % Schritten von 0 bis 60 % erhöht wurde (Abbildung 20).

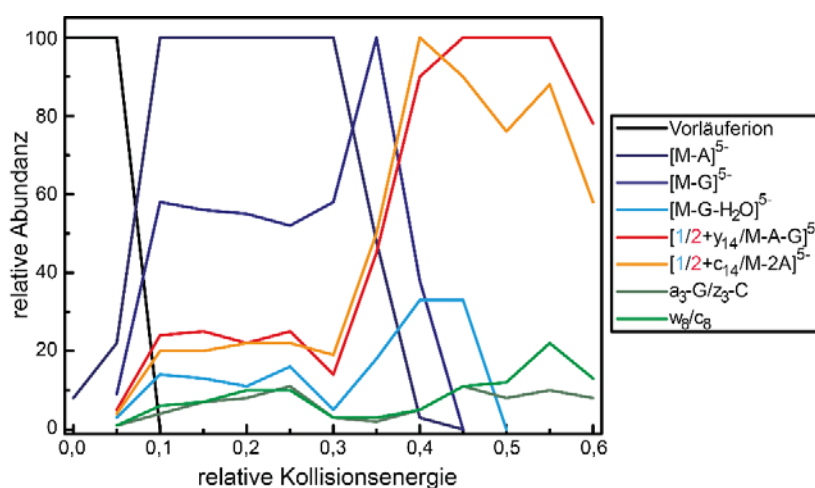


Abbildung 20. Relative Intensitäten der dominanten Fragmente des 15-mers 5'-CGG ATT AAT ATT AAA-3'/5'-TTT AAT ATT AAT CCG-3' im Ladungszustand 5- in Anhängigkeit der relativen Kollisionsenergie.

Der einfache Verlust von Adenin kann bereits nur bei einer Isolation des Vorläuferions mit 0 % relativer Kollisionsenergie beobachtet werden. Weitere Fragmente, welche auch einen Rückgratbruch beinhalteten, beispielsweise beim Fragment $[ss+y_{14}]$, konnten erst ab einer

Energie von 5 % in geringer Intensität nachgewiesen werden. Fragmente, die auf Einzelstränge zurückzuführen sind, können immer detektiert werden, machen jedoch nur einen kleinen Teil der Gesamtfragmentintensitäten aus (Fragment $[a_3\text{-G}/z_3\text{-C}]$ bzw. $[w_8]/[d_8]$). Das Fragment $[M\text{-A}]^{5-}$ konnte bis zu einer Energie von 30 % als abundantestes Signal nachgewiesen werden. Bei einer weiteren Erhöhung der Energie stieg zunächst die Intensität von $[M\text{-G}]^{5-}$ auf 100 %, anschließend konnte ab einer Energie von 40 % eine hohe Intensität für Fragmente aus doppeltem Basenverlust bzw. dem Verlust eines Nukleotids beobachtet werden. Diese Dissoziationsprozesse erforderten offensichtlich eine höhere Energie, als ein einfacher Basenverlust. Wie auch in Einzelsträngen scheint dieser Pfad der energetisch bevorzugte zu sein. Um einen besseren Einblick in das Fragmentierungsverhalten in Bezug auf eine mögliche Sequenzabhängigkeit in Fragmenttrends zu erhalten, wurden acht verschiedenen 15-mer Doppelstränge (A-H, Tabelle A1) mit unterschiedlichen Sequenzen bzw. einem GC-Anteil von 0-100 % analysiert. Zunächst war festzustellen, dass alle Doppelstränge ohne Probleme nachgewiesen werden konnten. Lediglich beim Strang H, welcher nur aus G und C besteht, konnten Dimere einzelner Stränge, welche sich mit den Doppelstrangsignalen teilweise überlagerten, beobachtet werden. Alle Stränge konnten im Ladungszustand 5- untersucht werden (Abbildung 21).

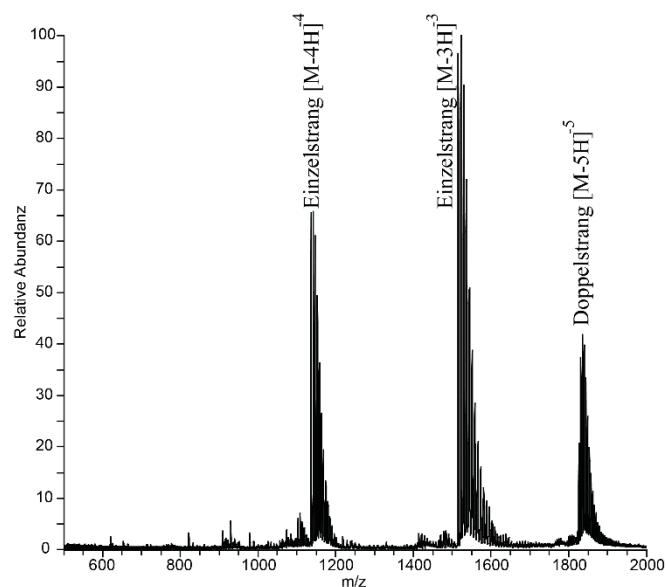


Abbildung 21. Negatives ESI-MS-Spektrum des Doppelstrangs B.

Neben dem Doppelstrangsignal konnten immer auch Signale der dreifach und vierfach negativ geladenen Einzelstränge nachgewiesen werden. Exemplarisch soll hier die Fragmentierung des Doppelstrangs B (B1+B2, Tabelle A1) dargestellt werden (Abbildung 22, Tabelle 1).

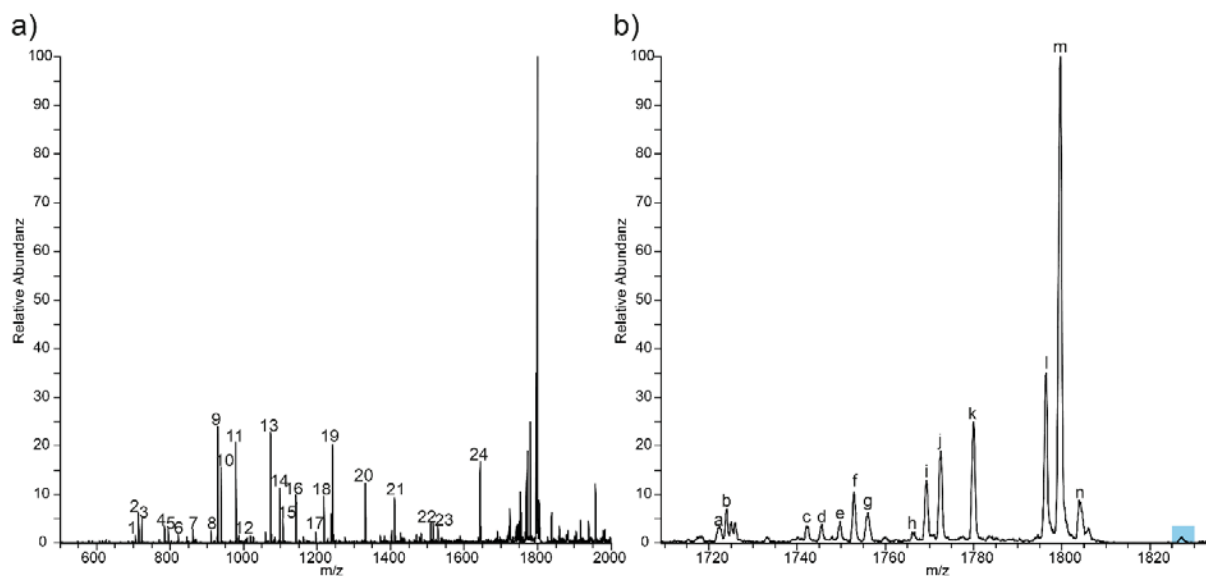


Abbildung 22. ESI-MS/MS-Spektrum des Doppelstrangs B 5'-AAA TTA GGC TTA TAT-3'/5'-ATA TAA GCC TAA TTT-3'. a) Spektrum von m/z 500-2000, Einzelstrangfragmente sind durch Zahlen angegeben. b) Spektrum Zoom von m/z 1730-1830, Doppelstrangfragmente sind in Kleinbuchstaben angegeben. Das Vorläuferion ist blau unterlegt.

Tabelle 1 Zuordnung der Fragmente des CID Spektrums des Doppelstrangs B. Die Einzelstrangfragmente sind entweder blau (Fragmente des Strangs 1), rot (Fragmente des Strangs 2) oder schwarz (Fragmente des Strang 1 und 2 haben das gleiche m/z Verhältnis) darstellt. Gleiches gilt für die Doppelstrangfragmente.

Einzelstrangfragment		Doppelstrangfragment	
1	$[c_5-A]^{2-}/[x_5-T]^{2-}$	a	$[1/2+c_{14}-G-T]^{5-}/[1/2+w_{14}-G-A]^{5-}/[1/2+x_{14}-2A]^{5-}$
2	$[a_3-A]^-/[z_3-T]^-$	b	$[1/2+w_{14}-G-T]^{5-}/[1/2+d_{14}-G-A]^{5-}/[1/2+x_{14}-A-T]^{5-}/[1/2+c_{14}-2A]^{5-}/[1/2+x_{14}-C-G]^{5-}$
3	$[y_3-T]^-/[a_3-T]^-/[y_3-A]^-/[a_3-A]^-$	c	$[1/2+b_{14}-C]^{5-}/[M-C-2G]^{5-}$
4	$[x_3-A]^-/[x_3-T]^-$	d	$[M-A-C-G]^{5-}/[M-2A-T]^{5-}/[M-G-2T]^{5-}/[1/2+x_{14}-G]^{5-}$
5	$[c_3-A]^-/[x_3-T]^-$	e	$[1/2+w_{14}-G]^{5-}/[M-2A-C]^{5-}/[M-3T]^{5-}$
6	$[y_6-A]^{2-}/[a_6-A]^{2-}$	f	$[1/2+c_{14}-T]^{5-}/[1/2+w_{14}-A]^{5-}/[M-2T-C]^{5-}$
7	$[w_6-A]^{2-}/[c_6-A]^{2-}$	g	$[1/2+d_{14}-T]^{5-}/[1/2+c_{14}-C]^{5-}/[M-T-2C]^{5-}$
8	$[x_3]^-$	h	$[M-2G]^{5-}$
9	$[w_3]^-/[c_3]^-$	i	$[M-A-G]^{5-}$
10	$[w_3]^-/[c_3]^-$	j	$[M-2A]^{5-}$
11	$[y_7-C]^{2-}/[a_7-G]^{2-}$	k	$[1/2+w_{14}]^{5-}$
12	$[a_7-A]^{2-}$	l	$[M-G]^{5-}$
13	$[w_7]^{2-}$	m	$[M-A]^{5-}$
14	$[c_4-A]^-/[x_4-T]^-$	n	$[M-C]^{5-}$
15	$[c_4-A]^-/[x_4-T]^-/[w_4-A]^-/[c_4-T]^-$		
16	$[y_8-C]^{2-}/[a_8-G]^{2-}/[a_8-C]^{2-}$		

17	$[w_{12}-A]^{3-}/[c_{12}-A]^{3-}/[d_{12}-T]^{3-}$
18	$[a_8]^{2-}/[w_8]^{2-}$
19	$[c_4]^-/[w_4]^-$
20	$[a_5-A]^-/[z_5-T]^-$
21	$[c_5-A]^-/[x_5-T]^-$
22	$[B2]^{3-}$
23	$[B1]^{3-}$
24	$[y_6-A]^-/[a_6-A]^-$

CID-Spektren wurden im Bereich von m/z 500 - 2000 aufgenommen. Im Bereich von m/z 500 bis etwa m/z 1600 konnten zahlreiche Fragmente der Einzelstränge nachgewiesen werden, welche auf eine Separierung der Einzelstränge mit anschließendem kovalenten Bindungsbruch zurück zu führen sind (Darstellung durch Zahlen, im Detail siehe Tabelle 1). Da in vorherigen Experimenten nachgewiesen wurde, dass die Ladungsverteilung auf die jeweiligen Einzelstränge gleichmäßig erfolgt, wurden bei der Zuordnung nur Fragmente der Ladungszustände 1- bis 3- berücksichtigt. Im Gegensatz zu CID-Spektren von Einzelsträngen sind die einzelnen Fragmentklassen gleichmäßiger in ihrer Intensität zwischen ca. 2 und 25 % relativer Intensität verteilt. Auch die Verteilung unter den beiden Einzelsträngen (ss bzw 1 und 2) ist weitestgehend gleich. Hauptsächlich konnten dabei w Fragmente und Strangbrüche mit Basenverlust ($[f-B]$) beobachtet werden. Bei einem GC Anteil zwischen 0 und 40 % (Strang A-E) konnten die Signale der dreifach negativ geladenen kompletten Einzelstränge nachgewiesen werden. Zwischen m/z 1600 und m/z 2000 waren fast ausschließlich Fragmente der Doppelstränge zu finden (Darstellung mit Kleinbuchstaben, im Detail siehe Tabelle 1). Auf Grund der Vollständigkeit, wurden auch in diesem m/z Bereich Einzelstrangfragmente zugeordnet, dabei ist zu bemerken, dass immer auch CID-Spektren der Einzelstränge aufgenommen und verglichen wurden. Dabei konnten in diesem hohen m/z Bereich nur sehr wenige Fragmente mit geringer Intensität nachgewiesen werden und können somit vernachlässigt werden. Bei der Zuordnung der Doppelstrangfragmente erwies sich, aufgrund der geringen Massenauflösung des MS ein Toleranzbereich von $\pm 0,8$ Da als sinnvoll. Zwar werden dadurch fast immer mehrere Fragmente zugeordnet, die Fragmentklassen bzw. deren m/z Bereich war jedoch in allen Doppelsträngen wieder zu finden. So kann im Beispiel des Strangs B zwar nicht eindeutig das Fragment $[1/2+c_{14}-G-T]^{5-}$ von $[1/2+w_{14}-G-A]^{5-}$ oder $[1/2+x_{14}-2A]^{5-}$ unterschieden werden, sie gehören jedoch alle der Klasse $[1/2+\text{Fragment 14} - 2 \text{ Basen}]^{5-}$ an. Es können mit Hilfe dieser Methode Trends für alle Doppelstränge erarbeitet werden. Der einfache Basenverlust stellte immer den abundantesten Peak dar. Bei einem GC-

Anteil von 0-40 % war der Adeninverlust dominant, bei 60-100 % GC war es der Guaninverlust. Während ebenfalls immer ein leichter Cytosinverlust bestand, konnte in keinem Fall ein einfacher Thyminverlust nachgewiesen werden. Da endständiges Thymin in den Strängen A-H nur am 3'-Ende vorhanden war, wurde ein 15-mer Doppelstrang der umgekehrten Sequenz des Strangs C gemessen (Crev). Auch hier wurde kein Thyminverlust beobachtet. Insgesamt lässt sich ein Trend zum einfachen Basenverlust aufstellen. G wird leicht bevorzugt vor A abgespalten, wobei in Abbildung 20 auch zu erkennen ist, dass der Vergleich der beiden energieabhängig sein kann. Cytosinverluste bestanden in allen Fällen, jedoch nur in geringer Intensität. Der Trend $G > A >> C >>> T$ steht demnach im Gegensatz zu den Präferenzen in Einzelsträngen.(146) Hier konnten ohne weiteres Thyminverluste beobachtet werden, während Cytosinverluste nur wenig auftraten. Des Weiteren konnten außerdem in den Strängen A-G eindeutig, ohne Überlappungen mit anderen Fragmenten, zweifache Basenverluste zugeordnet werden. Dabei waren erneut A und G Verluste im Vergleich dominant. Auch dreifache Basenverluste konnten eindeutig nachgewiesen werden (Anhang Abbildung A6). Neben diesen Basenverlusten konnten auch zahlreiche Rückgratbrüche eines der beiden Stränge im Doppelstrang erkannt werden. Am intensivsten waren dabei die Fragmente $[f_{14}]^{5-}$, welche durch einen kovalenten Bindungsbruch an der letzten Phosphateinheit im Rückgrat entstehen. In vier von acht Strängen (A-H) konnte beispielsweise das Fragment $[ss+w_{14}]^{5-}$ eindeutig und sehr intensiv nachgewiesen werden, jedoch gibt es bei zahlreichen anderen Fragmenten Überlappungen der Fragmentklassen. Des Weiteren wurde ein Bruch an der zweiten Phosphateinheit beobachtet, ohne dass die nicht-kovalente Bindung des Doppelstrangs aufgehoben wurde ($[f_{13}]$). Brüche im fortschreitenden Strang über die zweite Phosphateinheit hinaus konnten nicht beobachtet werden. Die größte Gruppe, wenn auch wenig abundant, stellten Fragmente der Klasse $[ss+f_{14}-1 \text{ Base}]^{5-}$. Die eindeutige Zuordnung wurde hier durch zahlreiche Überlappungen Fragmente insbesondere der gleichen Klasse erschwert. Insgesamt scheint es eine homogene Verteilung des einfachen Basenverlustes zu geben. Außerdem konnten Fragmente der Klasse $[ss+f_{14}-2 \text{ Basen}]^{5-}$ nachgewiesen werden. Dieser waren zwar von geringerer Abundanz als die der Klasse $[ss+f_{14}-1 \text{ Base}]^{5-}$, jedoch konnten hier eine eindeutigere Zuordnung durch nur wenige Überlappungen erfolgen. Die Ergebnisse können in einem Farbschema zusammengefasst werden (Abbildung 23).

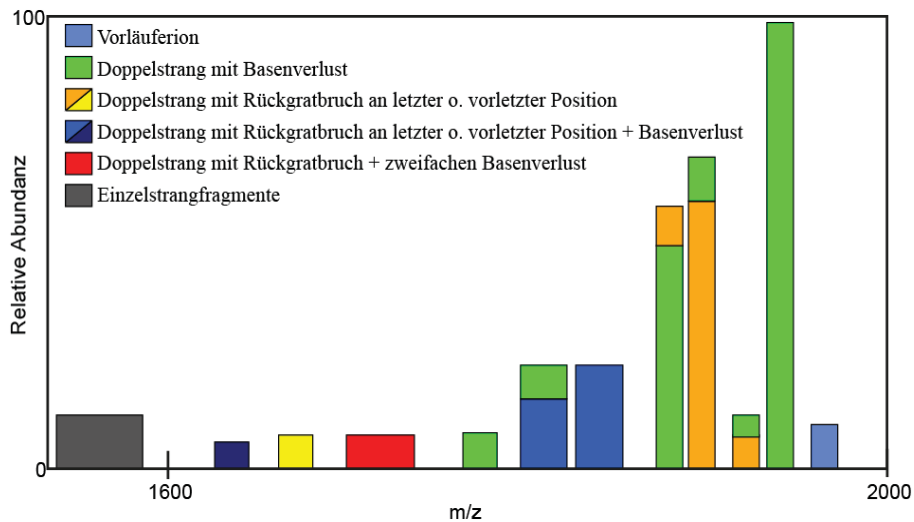


Abbildung 23. Verteilung der Fragmentklassen. Grün gibt den einfachen, zweifachen und dreifachen Basenverlust an und stellt damit die intensivste Fragmentklasse. Orange/gelb gibt einen einfachen Rückgratbruch an, wobei die Verteilung schmal, aber die Signale intensiv sind. Blau bzw. dunkelblau zeigt Fragmente des Rückgratbruches mit einfachem Basenverlust an. Diese Fragmente sind mit einer mittleren Intensität breit verteilt. Der Rückgratbruch mit zweifachem Basenverlust schließt sich an (rot) und zeigt die breiteste m/z Verteilung der Fragmente, jedoch nur geringe Intensitäten der Signale. Im unteren m/z Bereich befinden sich ausschließlich Einzelstrangsignale (grau).

Die endständige teilweise Aufspaltung der nicht-kovalenten Bindung mit anschließendem Basenverlust stellte die intensivste Fragmentklasse dar (■). Es konnte bis zu einem dreifachen Basenverlust Fragmente sicher nachgewiesen werden. In ebenfalls hoher Abundanz wurden $[f_{14}]$ - Fragmente, also ein Bruch des Rückgrates an der ersten Phosphateinheit festgestellt, ebenso wie an der zweiten Einheit (■). Mit einer breiten, jedoch minder intensiven Verteilung wurden Rückgratbrüche mit einfachem Basenverlust erfasst (■), diese Verluste traten auch zweifach auf (■). Unterhalb von m/z 1600 wurden nur noch Einzelstrangfragmente erzeugt (■).

Des Weiteren wurden Doppelstränge mit Fehlstellen untersucht (Tabelle A1). Es wurden vier Stränge mit abasischen Stellen, d.h. mit einer fehlenden Base, fragmentiert. Es konnte dabei keine Relevanz der Lokalisierung festgestellt werden. Das Fragmentierungsmuster änderte sich nicht signifikant, je nachdem ob sich die Fehlstelle am Ende oder in der Mitte befand. Es konnten erhöhte Intensitäten der Basenverluste, die gegenüber von Fehlstellen lagen, nachgewiesen werden. Diese Base konnte keine Wasserstoffbrückenbindungen zum komplementären Strang ausbilden und kann somit leichter abgespalten werden. Außerdem wurden nahezu keine $[ss+f_{13}-1 \text{ Base}]^{5-}$ und $[ss+f_{14}-2 \text{ Basen}]^{5-}$ Fragmente detektiert. Nur in einer Probe konnte ein einziges $[ss+f_{14}-2 \text{ Basen}]^{5-}$ Fragment in geringer Intensität nachgewiesen

werden. Dies könnte durch die Destabilisierung des Doppelstrangs durch Fehlstellen begünstigt werden. Es liegt dabei eine höhere Präferenz zur Einzelstrangseparierung als in den anderen Analyten vor. Diese Überlegung wird auch von der Tatsache unterstützt, dass kaum ein Doppelstrangsignal erfassbar war, sobald sich zwei Fehlstellen im gleichen Strang befanden. Dies zeigt auch den Unterschied zwischen der Flüssig- und der Gasphase. Während in der Gasphase ohne weiteres Fragmente mit gleich drei Basenverlusten beobachtet wurden, konnten im Übersichtspektrum kaum noch Doppelstränge nachgewiesen werden, sobald zwei abasische Seiten vorlagen. Dies kann zum einen in der Probenvorbereitung bedingt sein, also in der flüssigen Phase, es kann aber auch ein Effekt sein, der beim Übergang von der flüssigen in die Gasphase zum Tragen kommt. Dieses Problem trat nicht auf, wenn statt abasischen Stellen Fehlpaarungen, also keine GC-AT-Paarung, verwendet wurden. Dazu wurden vier Doppelstränge untersucht, welche ein oder zwei Fehlpaarungen an verschiedenen Stellen enthielten. Es wurde der Strang F mit 60 % GC-Anteil verwendet. Bei einer AG-Fehlpaarung innerhalb des Strangs konnte ein Anstieg des einfachen Adeninverlustes, sowie eine deutliche Zunahme zweifachen Guaninverlustes beobachtet werden. Bei einer endständigen CT-Fehlpaarung konnte keine Veränderung des Spektrums hervorgerufen werden. Überraschenderweise konnte auch hier trotz endständiger, destabilisierter Thyminbase kein [M-T]-Fragment erzeugt werden. Ausschließlich bei einer zweifachen Fehlpaarung (GT und AC, beide mittig) konnte einmalig das [M-T]⁵-Fragment nachgewiesen werden. Insgesamt konnten bei allen Fehlpaarungen deutlich weniger Fragmente generiert werden.

3.2.3. CID Experimente an Einzel- und Doppelstrang LNA

Für DNA-Analoga, wie beispielsweise LNA, sind bislang nur wenige MS/MS-Daten verfügbar. Wie bereits in Kapitel 3.1.2 kurz erwähnt, konnten Mcluckey *et al.* bereits CID-Spektren von Oligonukleotiden, welche auch LNA-Monomere enthielten, aufnehmen.⁽¹³²⁾ Bislang wurden weder Doppelstränge, noch reine LNA-Stränge untersucht. Auch Sequenzabhängigkeiten wurden noch nicht geprüft. Da LNA, wie in Kapitel 3.1.2 gezeigt, eine höhere Stabilität gegen Kollisionen aufweist, kann mit nur einer kleinen Anzahl verschiedener Stränge, nicht mit Sicherheit festgestellt werden, welche Fragmente von DNA- und welche von LNA-Monomeren stammen. Aus diesem Grund sollen im Folgenden sowohl verschiedene Sequenzen, als auch Ladungszustände, sowie Doppelstränge betrachtet werden. Die LNA-Stränge bestanden dabei ausschließlich aus LNA-Monomeren. Obwohl für LNA, wie auch für DNA, ein scharfer Fragmentierungspunkt festgestellt werden konnte, unterscheiden sich die

CID-Spektren erheblich. Zunächst fällt auf, dass wesentlich mehr Fragmente bei der Dissoziation von LNA- und bei DNA-Strängen entstehen (Abbildung 24).

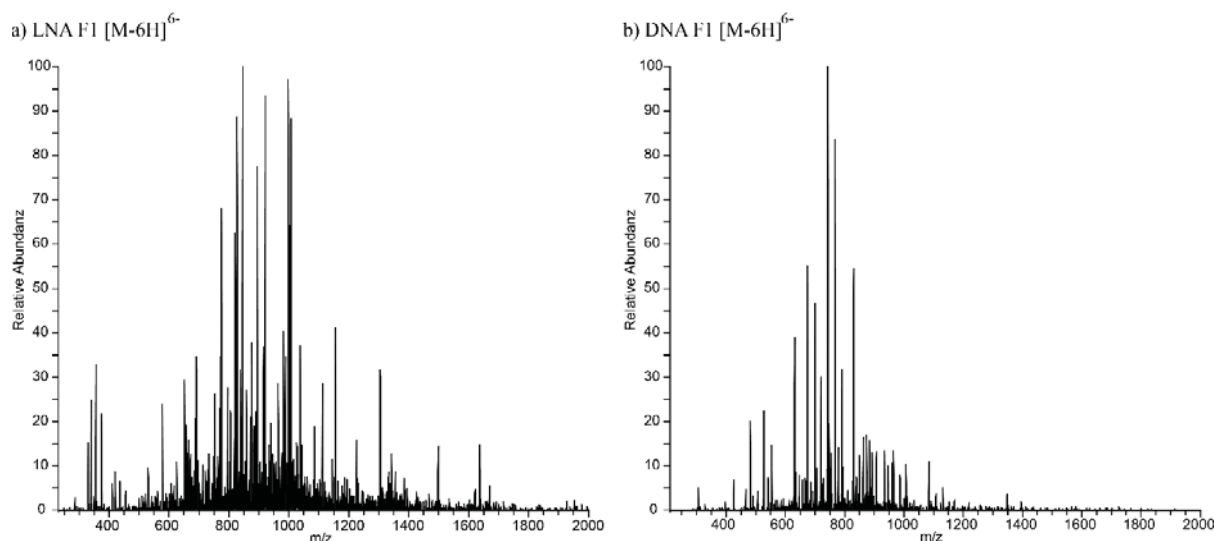


Abbildung 24. ESI-MS/MS-Spektrum des sechsfach negativ geladenen 15-mers F1 a) Spektrum des LNA-Strangs. b) Spektrum des DNA-Strangs.

Vergleicht man nur allein die Anzahl der entstandenen Fragmente eines 15-mers mit einer Intensität über 5 %, ergeben sich 2 bis 4,5-mal so viele Signale im Vergleich zum DNA-Spektrum (Tabelle 2).

Tabelle 2. Anzahl der beobachteten Fragmente über 5 % relativer Intensität über sechs Ladungszustände im Vergleich LNA zu DNA bei einer relativen Kollisionsenergie von 35 %.

Ladungszustand	Anzahl Fragmente der LNA	Anzahl Fragmente der DNA
9-	45	22
8-	50	13
7-	67	26
6-	68	29
5-	147	35
4-	174	39

Diese hohe Anzahl an Fragmenten ist auf die sterische Hinderung des Basenverlustes, durch die zusätzliche Verbrückung in LNA zurückzuführen. In DNA-Strängen ist der einfache Basenverlust der energetisch günstigste Weg. In CID-Experimenten sind diese Fragmente stets die dominantesten. Alle weiteren Fragmentierungswege benötigen mehr Aktivierungsenergie

und folgen oft dem Basenverlust, wie bei Fragmenten der Art $[f_x-B]$. Ist jedoch bei LNA erst einmal genug Energie zur Dissoziation aufgebracht, folgen Multirückgratbrüche, was zu einer Vielzahl von Fragmenten führt.

Da, wie zuvor beschrieben, DNA- bzw. LNA-MS/MS-Spektren aufgrund der geringen Intensität nicht hochaufgelöst gemessen werden konnten, wurden zur eindeutigen Zuordnung der Fragmente erneut 4-mere genutzt. Diese bestanden ausschließlich aus LNA-Monomeren. Jedes 4-mer enthielt jede der vier Nukleobasen. Diese wechselten sich in ihrer Sequenz ab, um eventuelle Sequenzabhängigkeiten, wie sie in DNA vorhanden waren, aufzuklären. Die Unterschiede im Fragmentmuster der CID-Spektren waren auch hier deutlich im Vergleich zu einem DNA 4-mer zu erkennen (Abbildung 25).

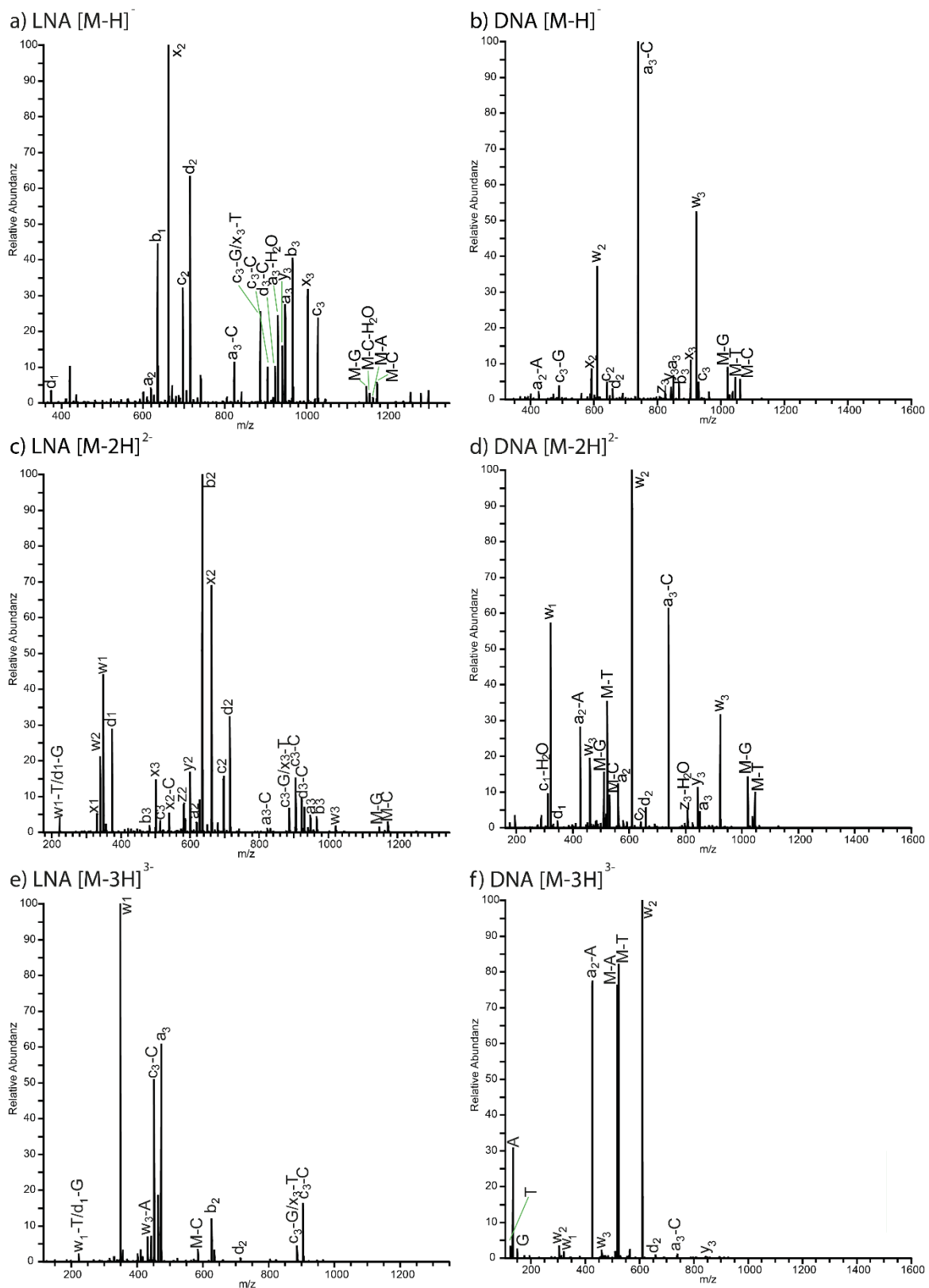


Abbildung 25. ESI-MS/MS-Spektren des 4-mers 5'-GACT-3'. a), c), e): CID-Spektren der Ladungszustände 1- (a), 2- (c) und 3- (e) der LNA. b), d), f): CID-Spektren der Ladungszustände 1- (b), 2- (d) und 3- (f) der DNA.

In allen DNA-Oligonukleotiden sind die Dissoziationspräferenzen gleich. Dabei sind insbesondere der einfache Basenverlust, w-Fragmente und [a_x-B]-Fragmente immer zu

beobachten und von hoher Intensität. Von einfachen Rückgratbrüchen und damit einhergehenden $[f_x-B]$ -Fragmenten sind nur wenige Fragmente von geringer Intensität nachweisbar. Bei den LNA-Strängen zeigte sich hingegen ein anderes Bild. Der einfache Basenverlust tritt mit sehr geringer Intensität auf. Des Weiteren war, im Gegensatz zur DNA, kein Trend in Bevorzugung der Basenabspaltung zu bestimmen. Damit verbunden sind ebenfalls kaum Signale der einfach negativ geladenen Nukleobasen zu beobachten. Stattdessen sind fast ausschließlich einfache Rückgratbrüche ohne anschließenden Basenverlust erfasst worden. Rückgratbrüche mit Basenverlust sind zwar die zweithäufigste Fragmentklasse, jedoch machen sie nur einen kleinen, wenig intensiven Teil des Fragmentmusters aus. Die dominierenden Fragmente, unabhängig von Sequenz oder Ladung, sind die einfachen Brüche des Rückgrates. Bei DNA treten in dieser Fragmentklasse nur die w Fragmente immer und in hoher Intensität auf, welche sehr typisch für ein DNA-MS/MS-Spektrum sind. Die LNA-Brüche zeigten keine Präferenz für eine Position. Alle Fragmente von vom Typ a-d und w-z waren gleichmäßig verteilt. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass die sterischen Hinderung durch die Verbrückung in LNA der Grund für diese Beobachtung ist. Bei DNA ist der Basenverlust energetisch bevorzugt, alle anderen Fragmente treten entweder bei der Erhöhung der Energie oder als Folge des Basenverlustes auf. Da in LNA dieser Dissoziationsweg gehemmt ist, muss also von Anfang an mehr Energie zur Fragmentierung aufgebracht werden. Der Basenverlust ist energetisch so ungünstig, dass er kaum auftrat. Hingegen erfolgten, nachdem einmal ein Schwellenwert an Energie aufgebracht wurde, multiple Rückgratbrüche.

Als nächstes wurden Doppelstranghybride untersucht. Zu diesem Zweck wurden komplementäre 15-mere hybridisiert. Je ein Strang enthielt ausschließlich DNA-, der andere ausschließlich LNA-Monomere. Zunächst ist zu sagen, dass die Verteilung im ESI-MS denen der DNA-Doppelstränge sehr ähnlich ist. Es konnte wieder der fünffach negativ geladenen Doppelstrang neben den vier- und dreifach negativ geladenen Einzelsträngen beobachtet werden (Abbildung 26).

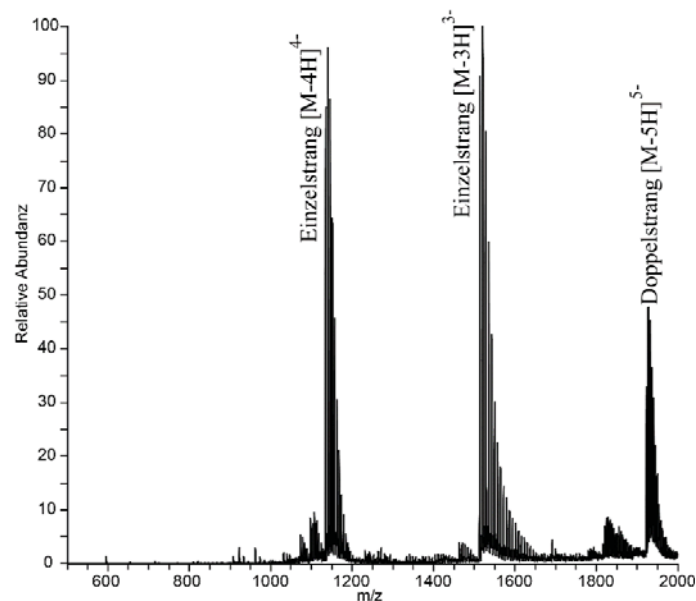


Abbildung 26. ESI-MS-Spektrum des LNA-DNA-Doppelstranghybrids F. Neben dem fünffach negativ geladenen Doppelstrangsignal konnten auch drei- und vierfach negativ geladenen Einzelstränge detektiert werden.

Der Strang F soll näher beschrieben und mit einem Doppelstrang der gleichen Sequenz aus DNA verglichen werden. Beim Vergleich der Doppelstränge von DNA- und LNA-DNA-Hybriden gleicher Sequenz konnten deutliche Unterschiede aber auch viele Gemeinsamkeiten beobachtet werden. Zunächst fiel auf, dass trotz annähernd gleicher Intensitätsverteilung im Spektrum und fast gleicher verwendeter relativer Kollisionsenergie (DNA mit 28 %, LNA mit 29 %) im Spektrum des Hybrid-Doppelstrangs wesentlich weniger Rauschen zu erkennen ist. Dieses chemische Rauschen der DNA lässt sich erneut auf die höhere Stabilität der LNA zurückführen. Da bei DNA beide Stränge gleich bevorzugt dissoziieren, treten auch viele wenig intensive Fragmente auf, welche sich kaum vom Rauschen abheben. Beim Hybrid wurde der DNA-Strang bevorzugt fragmentiert, während die LNA kaum zur Dissoziation neigte. Dies spiegelt sich auch deutlich in den Einzelstrangfragmenten wieder. Die Verteilung der verschiedenen Fragmentklassen war gut vergleichbar. (Abbildung 27).

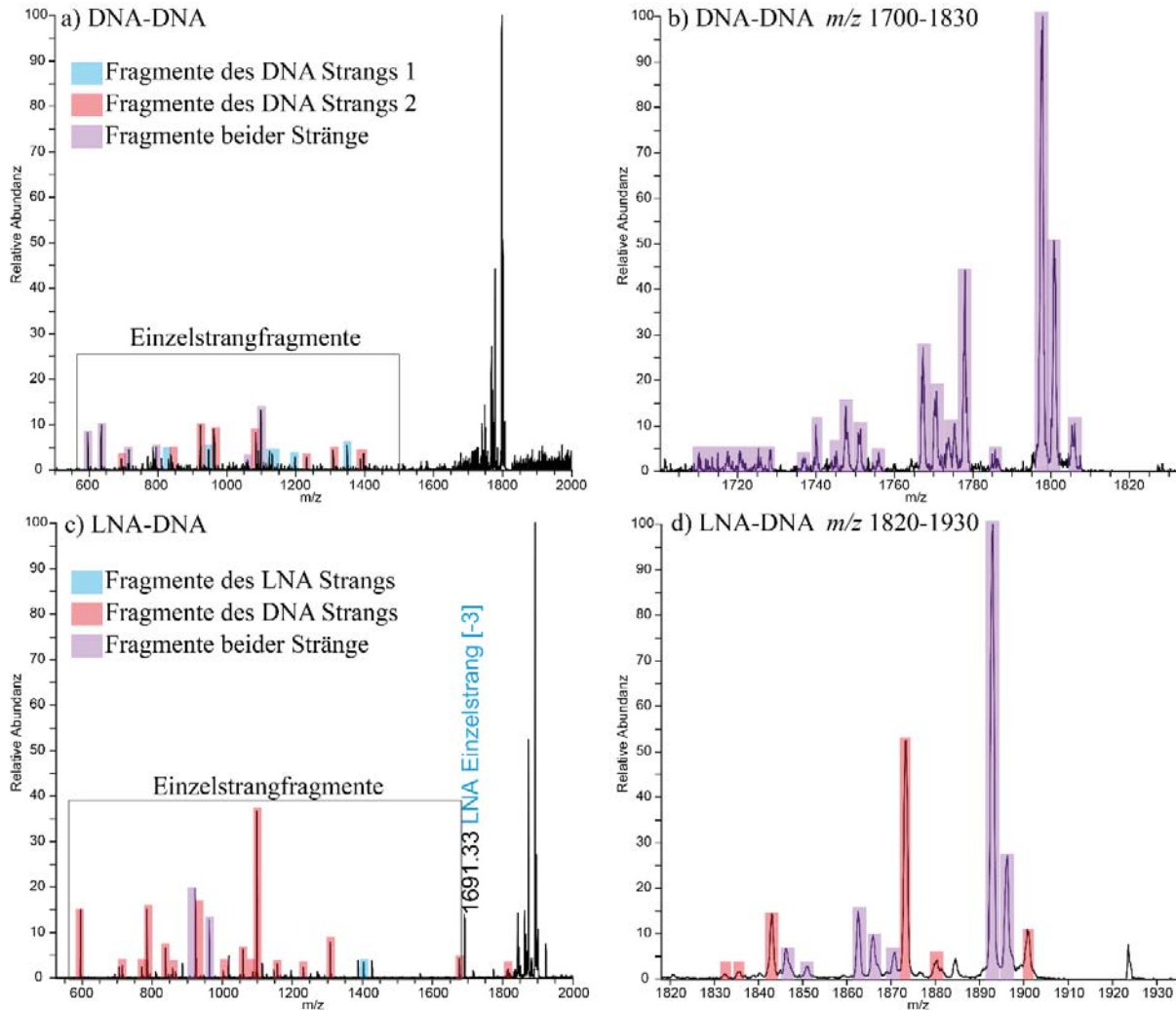


Abbildung 27. ESI-MS/MS-Spektren des Doppelstrangs F. a) CID-Spektrum des DNA-Doppelstrangs. b) CID-Spektrum des DNA-Doppelstrangs im m/z Bereich 1700-1830. c) CID-Spektrum des LNA-DNA-Hybrid-Doppelstrangs. d) CID-Spektrum des LNA-DNA-Hybrid-Doppelstrangs im m/z Bereich 1820-1930. Fragmente des Strangs F1 (DNA und LNA) sind blau dargestellt, solche vom Strang F2 rot. Überlaggerte m/z Werte beider Stränge sind diese lila dargestellt.

Im höheren m/z Bereich traten ausschließlich Fragmente der Doppelstränge auf, während zwischen m/z 500 bis ca. m/z 1650 nur Fragmente der Einzelstränge nachzuweisen waren. Beim DNA-Doppelstrang fanden sich gleich verteilt Einzelstrangfragmente beider Einzelstränge, wobei einige Signale aufgrund des gleichen m/z -Verhältnisses mehreren Fragmenten zugeordnet werden konnten (Fragmente von Strang 1 in blau, von 2 in rot). Das Hybrid weist dagegen nur ein Einzelstrangfragment auf, welches ausschließlich der LNA zugeordnet werden kann (Fragmente vom LNA-Strang in blau, von DNA in rot). Alle anderen waren entweder Fragmente des DNA-Einzelstrangs oder gehörten zu den wenigen, welche beiden zugeordnet werden konnten (lila). Insgesamt waren auch die relativen Intensitäten der Einzelstrangfragmente des Hybrids höher, obwohl sie fast nur aus einem statt zwei Strängen

resultierten. Wie in Kapitel 3.2.2. beschrieben, konnten komplette Einzelstränge nur bei Doppelsträngen mit hohem AT-Anteil nachgewiesen werden. Im Hybridspektrum konnte jedoch der dreifach negativ geladene LNA-Einzelstrang ohne weitere Fragmentierung in hoher Intensität nachgewiesen werden, was erneut auf die erhöhte Stabilität hinweist. Im hohen m/z -Bereich, also im Bereich der Doppelstrangfragmente, zeigt sich ein ähnliches Bild. Es wurden insgesamt weniger Fragmente beim Hybrid, als beim DNA-Strang erzeugt. Die Intensitätsverteilung und die auftretenden Fragmente sind jedoch weitestgehend gleich. Auffällig ist jedoch, dass kein explizierter Bruch des LNA-Strangs zu detektieren war. Lediglich Mehrfachzuordnungen beider Stränge traten auf. Zwar konnte im Falle des dargestellten DNA-Doppelstrangs F nicht unterschieden werden, ob das $[ss+w_{14}]^{5-}$ -Fragment vom Einzelstrang 1 oder 2 stammt, jedoch konnte aufgrund der Messungen der acht verschiedenen Doppelstränge gezeigt werden, dass beide DNA-Einzelstränge gleichmäßig fragmentieren. Des Weiteren wären die einfachen Basenverluste im Falle von Cytosin zu unterscheiden gewesen, da Cytosin am LNA-Strang eine zusätzliche Methylgruppe aufweist. Es konnte jedoch kein LNA-Cytosinverlust beobachtet werden. Insgesamt kann festgehalten werden, dass sich die höhere Stabilität der LNA auch im Doppelstrang bemerkbar macht, was in multiplen Strangbrüchen der DNA und nur wenigen Fragmenten der LNA resultiert.

Insgesamt konnte bei der Fragmentierung von LNA mittels CID ein deutlicher Unterschied zu DNA festgestellt werden. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den vorher untersuchten Fragmentierungspunkten und den CCS. Einzelsträngige LNA zeigte keine Fragmentierungspräferenz in Bezug auf den Abschnitt des Rückgratbruchs. Im Gegensatz zu DNA traten fast keine einfachen Basenverluste auf, während der Rückgratbruch dominant war. Beim Doppelstrang-Hybrid konnten ausschließlich Brüche des DNA-Strangs analysiert werden. Stattdessen konnte der dreifach negativ geladenen LNA-Einzelstrang mit hoher Intensität detektiert werden. Im Gegensatz dazu wiesen DNA-Doppelstränge immer eine gleichmäßige Verteilung von Brüchen beider Stränge auf. All dies verdeutlicht erneut die hohe Stabilität von LNA bezüglich ihres Fragmentierungsverhaltens.

3.3. Vakuum-ultraviolette Strahlung als neue MS/MS Methode

3.3.1. Instrumentierung

In den vorherigen Kapiteln wurde wiederholt die mangelnde Signalintensität der Oligonukleotide in MS/MS-Experimenten erwähnt. Um einen Weg zu finden, die Intensitäten der Fragmente zu erhöhen, wurde ein neuartiger Aufbau zur Fragmentierung und Nachionisierung getestet. Dieser basierte auf ionisierender Strahlung, d.h. auf einer kontinuierlichen, punktförmigen Lichtquelle im VUV Bereich, welche aufgrund der hochenergetischen Strahlung in der Lage ist, Moleküle zu ionisieren. So kann aus jedem entstandenen Fragment, auch solchen, die aus der Dissoziation ungeladen hervorgehen, ein geladenes, d.h. in der MS detektierbares Teilchen werden. Die verwendete kommerziell erhältliche Deuteriumlampe weist eine breite Emission von 400 nm bis zu 115 nm auf (Abbildung 28).

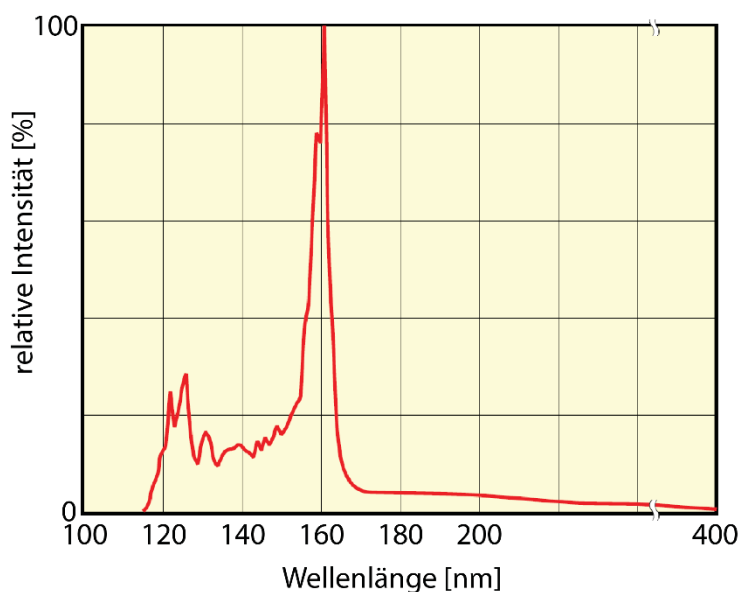


Abbildung 28. Emissionsspektrum der verwendeten Deuteriumlampe. Abbildung verändert nach (147).

In der linearen Ionenfalle (LTQ, Thermo Fischer) befindet sich hinter der Ionenfalle eine Aluminiumflansch. Diese Öffnung hinter dem Flansch dient der Kopplung mit einem FT-ICR oder einer Orbitrap. Über diese Öffnung wurde die VUV Lampe eingefügt (Abbildung 29).

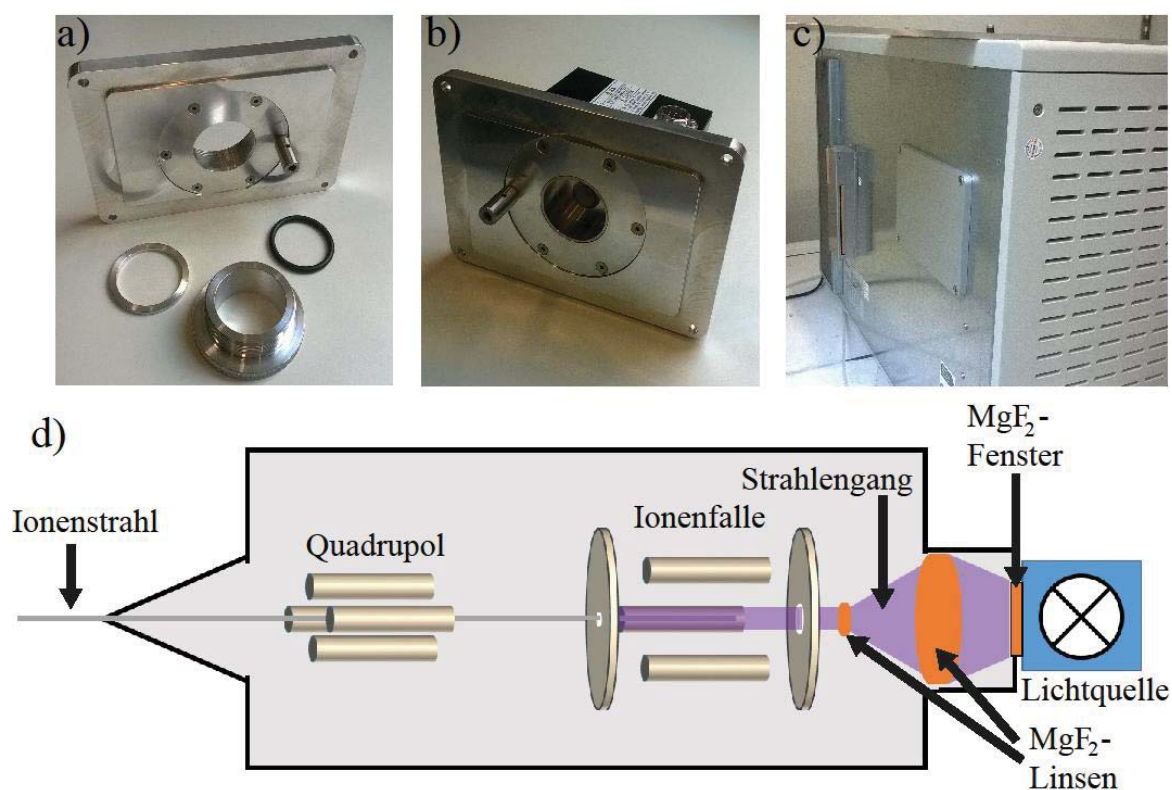


Abbildung 29. a) modifizierter Aluminiumflansch mit zentraler Bohrung zum Haltern der VUV-Lampe. b) integrierte VUV-Lampe. c) Rückseite der Ionenfalle mit Flansch. d) Schematischer Aufbau der VUV Lampe im MS. Während der Ionenstrahl von vorn in die Ionenfalle geleitet wird, wird das VUV-Licht hinten fokussiert und in die Ionenfalle geleitet.

Die Ionenfalle befindet sich etwa 7 cm von der Gehäusewand entfernt und weist nur eine kleine runde Öffnung von etwa 5 mm Durchmesser auf. Da die Lampe eine punktförmige divergente Lichtquelle ist, musste ihr Strahlengang rekollimiert und fokussiert werden. Dies geschieht zum einen, um einen besseren Lichttransfer in der Falle zu erreichen, aber auch um Streulicht abzufangen, welches in der Lage ist, Elektronen aus Bauteilen zu schlagen und dadurch ein erhöhtes Rauschen zu erzeugen. Zunächst wurde eine einzelne Magnesiumfluoridlinse (25 mm Durchmesser, 50mm Brennweite, 5 mm Stärke, Thorlabs) bzw. eine einzelne Irisblende (Öffnung 5 mm) verbaut und die Fragmentierung an einem 4-mer Oligonukleotid getestet. Die optischen Bauteile wurden über eine in der Platte befestigte Führungsstange montiert. Magnesiumfluorid eignet sich als Linsenmaterial für VUV besonders gut, da es eines der wenigen Materialien ist, welches in diesem Bereich wenig absorbiert. Trotzdem absorbiert es bei 120 nm schon etwa 40 % des Lichtes bei einer Linsendicke von 5 mm (Transmissionsspektrum im Anhang A7). (Abbildung 30).

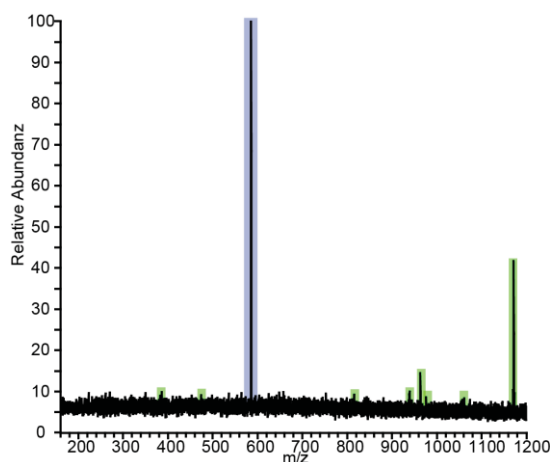


Abbildung 30. ESI-MS/MS-Spektrum des 4-mers 5'-CTGA-3' unter Verwendung einer MgF_2 Linse. Das Signal m/z 585 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ wurde isoliert und 20 s mit VUV bestrahlt. Die zum Oligonukleotid gehörigen Fragmente sind grün (nähere Fragmentbeschreibung in Kapitel 3.3.2) unterlegt, das Vorläuferion ist blau unterlegt.

Da bei der Verwendung einer Linse oder Blende nur wenige Fragmentationen erzeugt wurden, wurden als nächstes zwei statt einer MgF_2 -Linsen verwendet. Diese absorbierten die Strahlung jedoch zu stark, so dass keine Fragmentierung mehr zu beobachten war. Anschließend wurde eine Kombination getestet. Die Kombination einer Linse direkt hinter der Lampe, um möglichst viel Streulicht zu fangen, mit zwei Irisblenden, lieferten gute Ergebnisse. Es musste jedoch zusätzlich ein Zylinder eingebaut werden, um Streulicht abzufangen und damit das elektrische Detektorrauschen zu reduzieren (Abbildung 31).

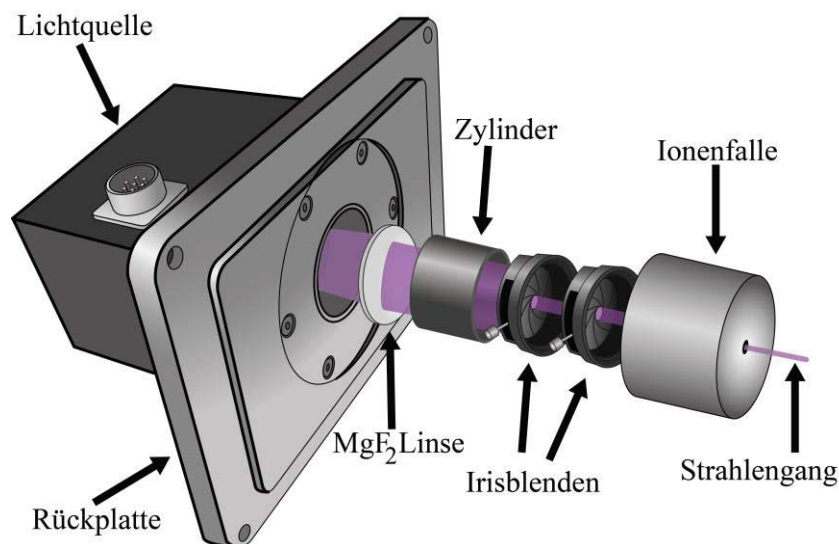


Abbildung 31. Darstellung der VUV Lampe mit MgF_2 -Linse, Zylinder und zwei Irisblenden. Das Licht wird durch die Ionenfalle fokussiert.

Diese Konstruktion (im Folgenden als Konstruktion I bezeichnet) wurde erneut über die Führungsstange befestigt und lieferte gute Resultate bezüglich der Fragmentausbeuten. Mit

Hilfe dieses Aufbaus konnte erstmals Oligonukleotide, Peptide und Adenosintriphosphat fragmentiert werden (ausführlich in Kapitel 3.3.2, Abbildung 32).

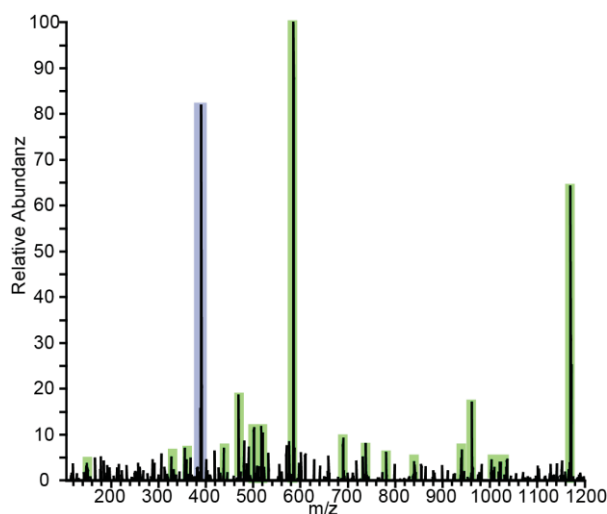


Abbildung 32. ESI-MS/MS-Spektrum des 4-mers 5'-CTGA-3'. Das Signal m/z 390 $[M-3H]^{3-}$ wurde isoliert und 15 s mit VUV-Licht bestrahlt. Die zum Oligonukleotid gehörigen Fragmente sind grün unterlegt (nähere Fragmentbeschreibung in Kapitel 3.3.2), das Vorläuferion ist blau unterlegt.

Da insgesamt zwar eine sehr viel höhere Fragmentierungseffizienz erreicht werden konnte, diese jedoch nicht ausreichend war, um alle Vorläuferionen vollständig zu dissoziieren, musste ein Weg gefunden werden, möglichst viel Licht zu sammeln, dabei aber nicht unnötig viel durch das Linsenmaterial zu absorbieren. Zu diesem Zweck wurden zwei weitere MgF_2 -Linsen angefertigt. Eine plankonvexe Linse mit 1,2 cm Durchmesser und einer Dicke von 2,5 mm wurde als Sammellinse direkt vor der Lampe gefertigt, eine plankonkave Linse mit 5 mm Durchmesser und einer Dicke von ~ 1 mm diente zur Parallelisierung des Lichtes. Bislang wurde der Strahlengang manuell justiert. Dafür wurden Langlöcher am Rand der Aluminiumplatte genutzt, wobei hinter der Ionenfalle die Lichtdurchlässigkeit geprüft wurde. Um Passgenauigkeit zu erreichen, wurde in der nächsten Konstruktion ein Teflonzylinder verwendet, welcher genau in die Öffnung der Platte passte. Die Linsen wurden ebenfalls in Teflonringen fixiert. Innerhalb des Zylinders wurden weitere Teflonringe verschiedenster Breiten als Abstandshalter genutzt, um die plankonkave Linse verschieben zu können (Im Folgenden Konstruktion II genannt, Abbildung 33).



Abbildung 33. Teflonzylinder mit Abstandsrings und Linsen in den jeweiligen Halterungen.

Bei einem maximalen Abstand der Linsen zu einander zeigt sich für das 4-mer Oligonukleotid eine deutlich erhöhte Fragmentierung bei einer Bestrahlung von 2 s. Im unteren m/z -Bereich (ca. m/z 0-500) jedoch wurden bei geringen Bestrahlungszeiten eine Vielzahl von Teflonfragmenten erzeugt (Abbildung 34).

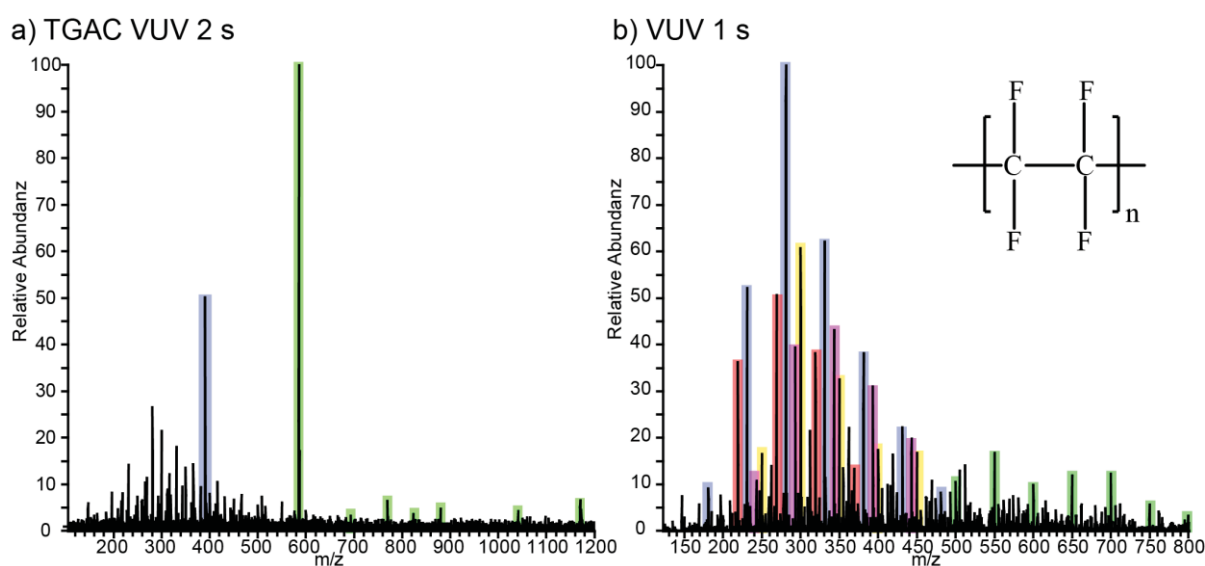


Abbildung 34. a) ESI-MS/MS-Spektrum des 4-mers 5'-TGAC-3'. Das Signal m/z 390 $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ wurde isoliert und 2 s bestrahlt. Die zum Oligonukleotid gehörigen Fragmente sind grün unterlegt (nähere Fragmentbeschreibung in Kapitel 3.3.2), das Vorläuferion ist blau unterlegt. Im unteren m/z Bereich befinden sich Teflonfragmente. b) Vergleichsspektrum mit Teflonzylinder ohne Analyt bei 1 s Bestrahlung. Alle Fragmente stammen vom Teflon. Zusammengehörige Fragmente sind farblich gleich gekennzeichnet.

Auch bei verschiedenen Linsenabständen konnte kein besseres Ergebnis erzielt werden. Daher wurde in einer weiteren Konstruktion (III) Aluminium verwendet. Die MgF_2 Linsen wurden in

den Teflonhalterungen belassen und in zwei Aluminiumscheiben eingebracht. Die Scheiben konnten auf zwei Führungsstangen an der Rückplatte direkt bewegt werden (Abbildung 35).



Abbildung 35. Aluminiumscheiben mit Linsen. Die Ausbuchtung der linken Scheibe dient zur besseren Bündelung des Lichtes durch Positionieren der ersten Linse direkt an der Lampe.

Während die größere Sammellinse direkt vor der Lampe positioniert wurde, wurde die kleinere Linse verschoben, um eine optimale Position zu ermitteln. Des Weiteren mussten zwischen bzw. nach der zweiten Platte eloxierte Aluminiumzylinder zum Abfangen des Streulichtes angebracht werden, da sonst erneut ein deutlich erhöhtes Rauschen beobachtet werden konnte. Trotzdem konnte keine höhere Fragmentierungseffizienz erreicht werden (Abbildung 36).

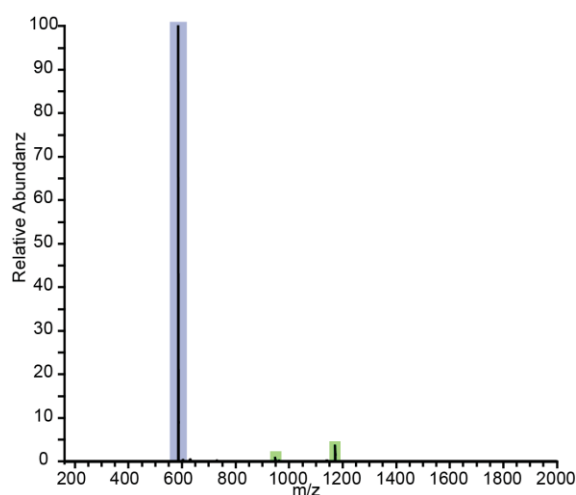


Abbildung 36 ESI-MS/MS-Spektrum des 4-mers 5'-TGAC-3'. Das Signal m/z 585 $[M-2H]^{2-}$ wurde isoliert und 10 s bestrahlt. Die zum Oligonukleotid gehörigen Fragmente sind grün unterlegt, das Vorläuferion ist blau unterlegt.

Es konnten nur wenige Fragmente mit niedrigen Intensitäten erzeugt werden (nähere Fragmentbeschreibung in Kapitel 3.3.2), auch eine Verschiebung der Platten brachte keine höhere Fragmentierungseffizienz.

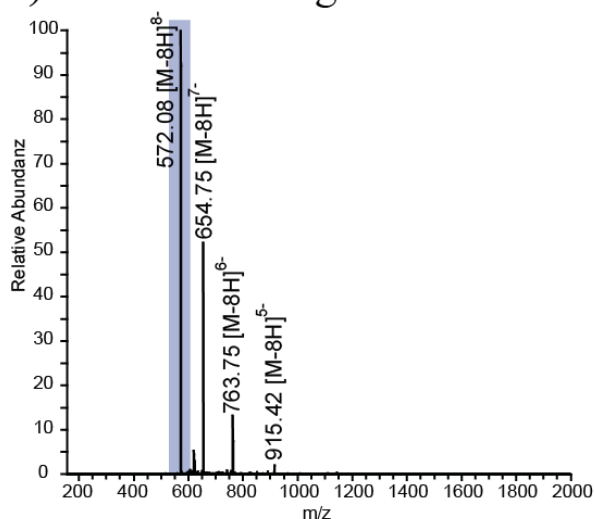
3.3.2. VUV MS/MS in der Anwendung

Nachdem verschiedene Konstruktionen für die auf VUV-Licht-basierende neue MS/MS-Methode getestet wurden, sollen nun verschiedene Dissoziationspfade bei unterschiedlichen Probenklassen beschrieben werden.

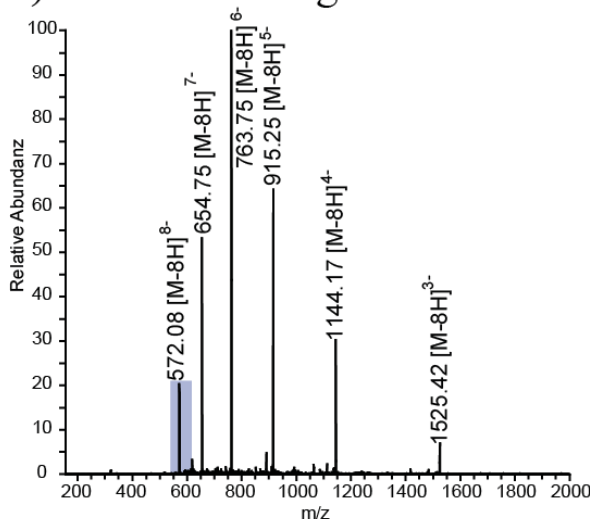
Höhere Ladungszustände

Zunächst sollten mehrfachgeladene Biomoleküle bestrahlt werden. Zu diesem Zweck wurde das Oligonukleotid D1 (siehe Anhang) und Lysozym verwendet, um sowohl den positiven, als auch den negativen Ionenmodus nutzen und vergleichen zu können. Dabei wurde das Signal jedes ersichtlichen Ladungszustandes isoliert und bestrahlt. Beispielfhaft soll hier das Spektrum des Ladungszustandes $[M-8H]^{8-}$ des Oligonukleotids D1 diskutiert werden, welches mit Konstruktion I gemessen wurde (Abbildung 37).

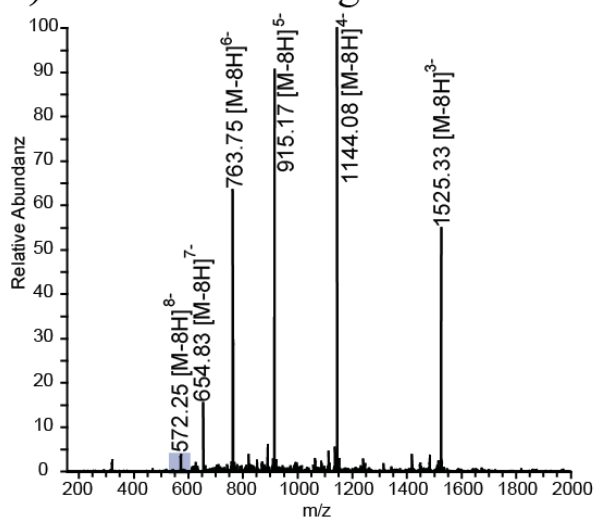
a) 1 s Bestrahlung



b) 5 s Bestrahlung



c) 10 s Bestrahlung



d) 20 s Bestrahlung

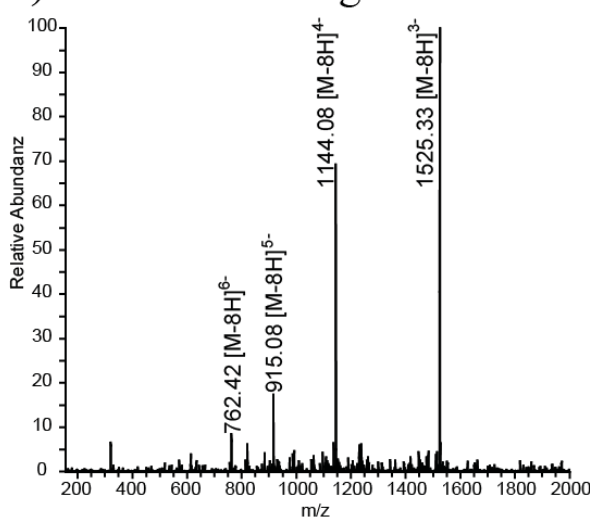


Abbildung 37. ESI-MS/MS-Spektrum des Oligonukleotids D1. Das Signal m/z 572 wurde isoliert und 1 s (a), 5 s (b), 10 s (c) und 20 s (d) mittels VUV-Licht bestrahlt. Das Vorläuferion ist blau unterlegt.

Bei mehrfach negativ geladenen Ionen konnte als erster Schritt eine Ladungsreduktion durch Elektronenverlust beobachtet werden. Das Signal m/z 572 $[M-8H]^{8-}$ des 15-mers wurde zwischen 1 und 20 s lang bestrahlt. Schon bei 1 s Bestrahlungsdauer konnte eine Ladungsreduktion bis zu vier Ladungen (m/z 915,42 $[M-8H]^{5-}$) beobachtet werden. Bei einer erhöhten Bestrahlungszeit konnten mehr und mehr Ladungsreduktionen bis hin zum Zustand $[M-8H]^{3-}$ erzeugt werden. Es wurden also insgesamt fünf Elektronen herausgeschlagen. Ein

komplementäres Phänomen trat beim mehrfach positiv geladenen Lysozym auf (Abbildung 38).

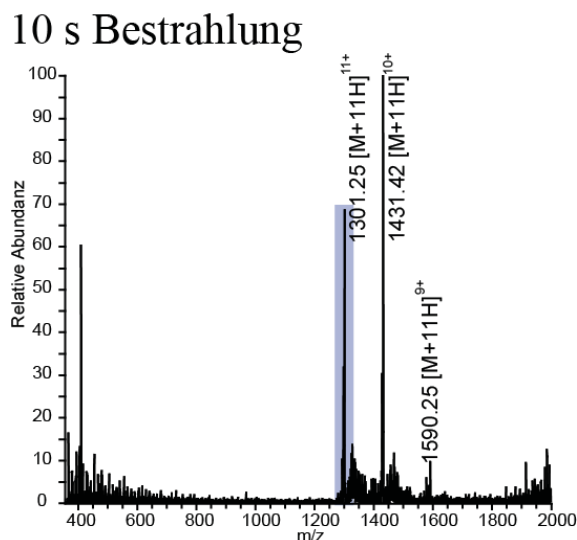


Abbildung 38. ESI-MS/MS-Spektrum des Lysozymsignals m/z 1301,25 $[M+11H]^{11+}$ bei einer Bestrahlungszeit von 10 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Verwendet wurde Kontruktion II.

Würden Elektronen herausgeschlagen werden, sollte aus dem Vorläuferion $[M+11H]^{11+}$ die Spezies $[M+11H]^{12+}$ entstehen, stattdessen entsteht $[M+11H]^{10+}$. Dies ist wahrscheinlich, wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, auf aus der Appatur herausgeschlagene Elektronen zurückzuführen. Diese können sich frei bewegen und sind ausreichend energiearm, um sich an ein positiv geladenes Ion anzulagern, während der Effekt bei negativ geladenen Ionen durch die Coulombabstoßung nicht beobachtet werden kann. Mit steigender Bestrahlungsdauer traten außerdem in beiden Versuchen Fragmentationen auf, welche aus dem Vorläuferion oder auch aus den reduzierten Ladungszuständen entstanden. Die Art der Fragmentationen unterschied sich dabei nicht von denen, die aus dem Vorläuferion direkt gebildet wurden.

Durch die Anlagerung von Elektronen im positiven Modus bzw. das Herausschlagen von Elektronen im negativen Modus besteht die Möglichkeit, auch Fragmente zu analysieren, welche in anderen Methoden nicht zu erfassen sind. Gerade bei einfach geladenen Vorläuferionen, oder bei lokalisierten Ladungen können Fragmente, welche nicht die Ladung tragen, nicht detektiert werden. VUV könnte hier die Möglichkeit einer Nachionisierung bieten.

Nukleotide

Oligonukleotide wurden bereits in den letzten Kapiteln als vielseitige Proben beschrieben, mit deren Hilfe ein besseres Verständnis für das Verhalten von großen Molekülen in der Gasphase, insbesondere im MS- und bei MS/MS-Prozessen, erreicht werden konnte. Von daher sollten als erstes Nukleotide als Probe für die neue MS/MS-Technik dienen, welche im Folgenden als VUVID (*vacuum ultraviolet induced dissociation*) bezeichnet wird. Zunächst wurde Adenosintriphosphat bestrahlt. Im Vergleich zu CID wurden dabei wesentlich mehr Fragmente generiert. Auch die Intensitätsverteilung innerhalb der Fragmente unterschied sich stark (Abbildung 39).

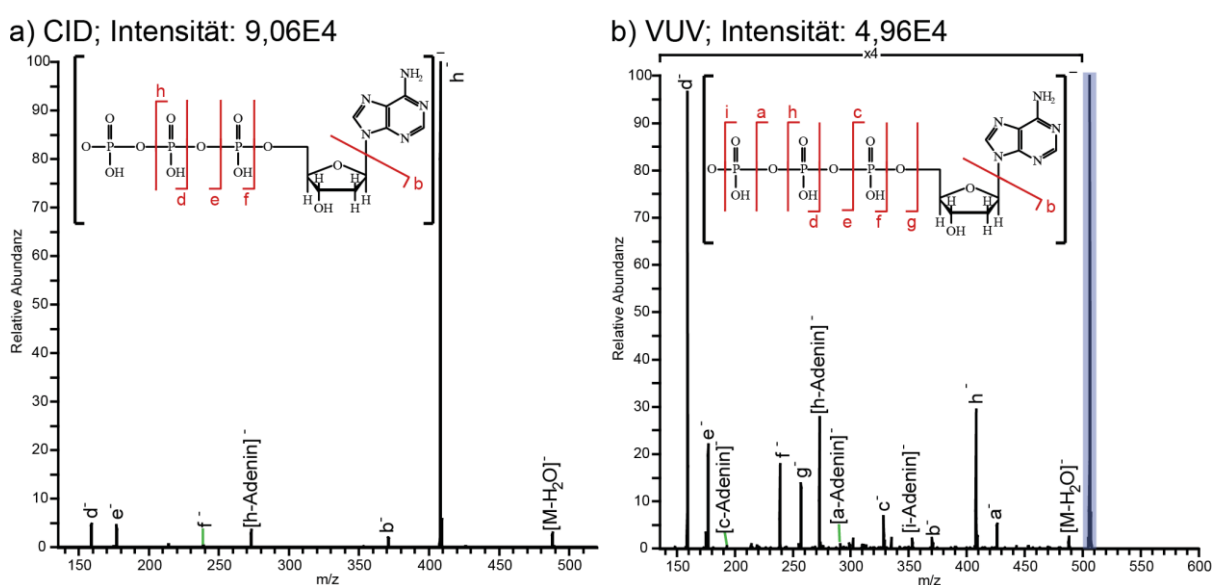
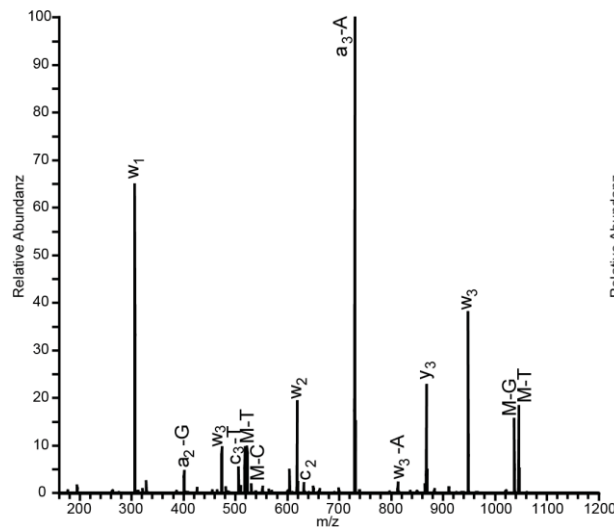


Abbildung 39. ESI-MS/MS-Spektren vom einfach negativ geladenen Adenosintriphosphat. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Die analysierten Fragmente sind schematisch dargestellt, das Vorläuferion ist blau unterlegt. Der Vergrößerungsfaktor ist angezeigt.

Mit VUV konnte eine fast 100 % höhere Fragmentausbeute erreicht werden als mit CID. Es waren neben zahlreichen Brüchen zwischen den einzelnen Phosphateinheiten auch mehr kombinierte Fragmente aus einem Adeninverlust und einem weiteren Bruch zwischen den Phosphaten vorhanden. Die relativen Intensitäten gleicher Fragmente unterschieden sich, bis auf das Fragment e, deutlich. Während beispielsweise das Fragment h in CID das abundanteste ist, wurde es mit VUVID nur mit ~30 % erzeugt. Hingegen konnten gerade kleinere Fragmente, wie d als dominantestes Fragment, wesentlich intensiver in VUVID beobachtet werden. Auch bei der Bestrahlung eines 4-mer Oligonukleotids konnte die Fragmentierung des Rückgrates beobachtet werden (Abbildung 40).

a) CID; Intensität: 4,54E2



b) VUV; Intensität: 4,44E2

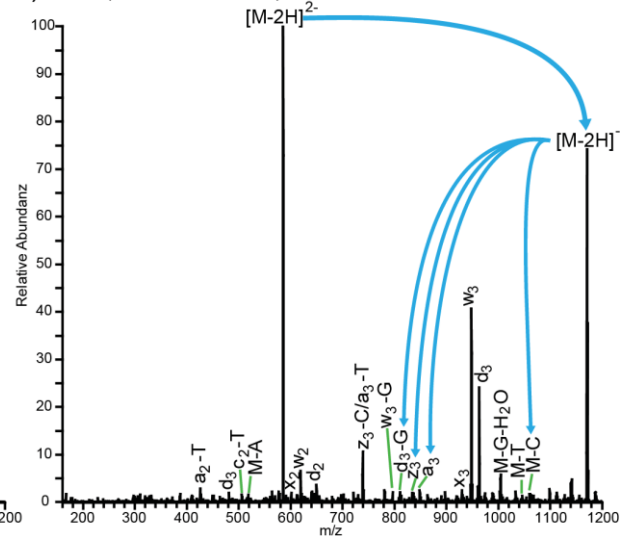


Abbildung 40. ESI-MS/MS-Spektrum des 4-mers 5'-TGAC-3' im Ladungszustand 2-. a) CID-Spektrum bei 35 % Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungszeit von 60 s mit Konstruktion I. Fragmente, die aus der elektronenreduzierten Spezies resultierten, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Im Vergleich zum CID-Spektrum fallen neben dem primären Reaktionsweg des Elektronenverlustes weitere Unterschiede auf. Zwar werden bei beiden Methoden die bevorzugten w-Fragmente gebildet, jedoch wurden bei VUVID nicht nur zusätzlich Fragmente aus der elektronenreduzierten Spezies erzeugt, auch insgesamt konnten mehr Fragmente mittels VUV generiert werden. Ebenfalls unterscheiden sich die Identitäten der Fragmente. So konnten beispielsweise d-Fragmente in hoher Intensität beobachtet werden, welche bei CID nicht auftraten. Das Signal des d₃-Fragments stellt so beispielsweise das zweitintensivste Fragment nach w₃ dar. Auch der Wasserverlust beim Fragment [M-G-H₂O]⁻ konnte in VUV beobachtet werden, während es bei CID nicht erzeugt wurde. Auch die Präferenzen der auf einen Strangbruch folgenden Basenverluste scheinen anders zu liegen. Während a₃-A in CID das abundanteste Signal stellte, konnte es in VUVID nicht beobachtet werden. Stattdessen wurde bei VUVID a₃-T/z₃-C erzeugt. Auch Doppelstränge wurden zum Vergleich mittels VUVID fragmentiert (Abbildung 41).

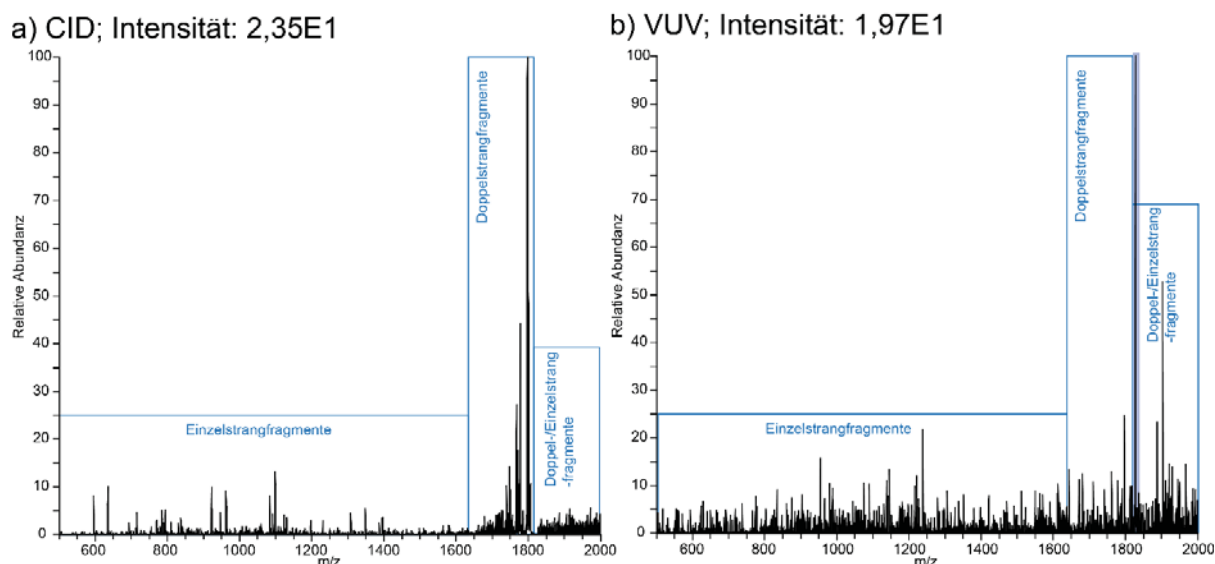


Abbildung 41. ESI-MS/MS-Spektren eines Doppelstrang 15-mers im Ladungszustand 5-. a) CID Spektrum bei 28 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungszeit von 30 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Die verschiedenen Fragmentklassenbereiche sind markiert.

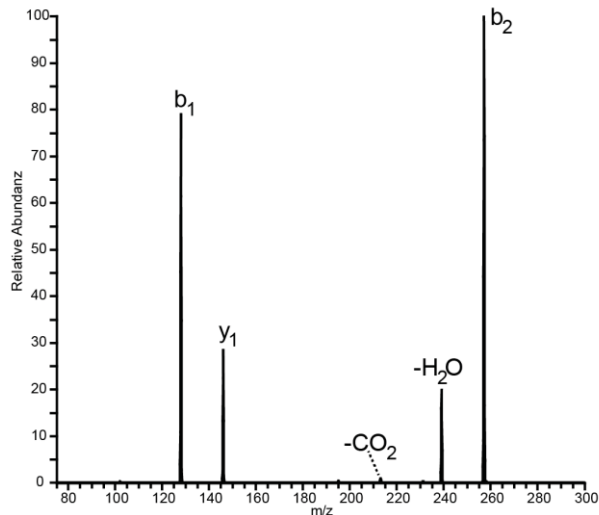
Im unteren Bereich von m/z 500- ~1600 konnten bei VUV, wie auch bei CID nur Einzelstrangfragmente analysiert werden. Bei VUVID wurden außerdem vermehrt dreifach negativ geladene Einzelstrangfragmente gebildet. Im Bereich von m/z 1600- ~1800 konnten viele der in CID erzeugte Doppelstrangfragmente auch in VUVID beobachtet werden. Hingegen wies der Bereich oberhalb des Vorläuferions in VUVID viele Fragmente des vierfach negativ geladenen Doppelstrangs und große Fragmente der Einzelstränge auf, welche im CID im Rauschen untergingen. Im Gegensatz zur CID wurde mit VUVID eine hohe Anzahl Fragmente gebildet, während das Vorläuferion noch das intensivste Signal darstellte.

Zum Weiteren Vergleich wurden auch andere Proben verschiedener Stoffklassen analysiert. So auch Kohlenhydrate, kleine Moleküle, Farbstoffe und Peptide.

Peptide

Als nächstes wurden Peptide der VUVID unterzogen. Dazu wurde als erstes das Dimer Glu-Glu fragmentiert (Abbildung 42).

a) CID; Intensität: 6,59E4



b) VUV; Intensität: 9,32E4

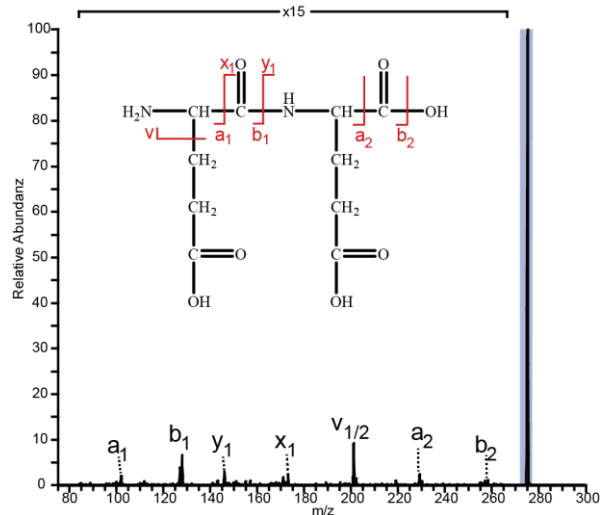


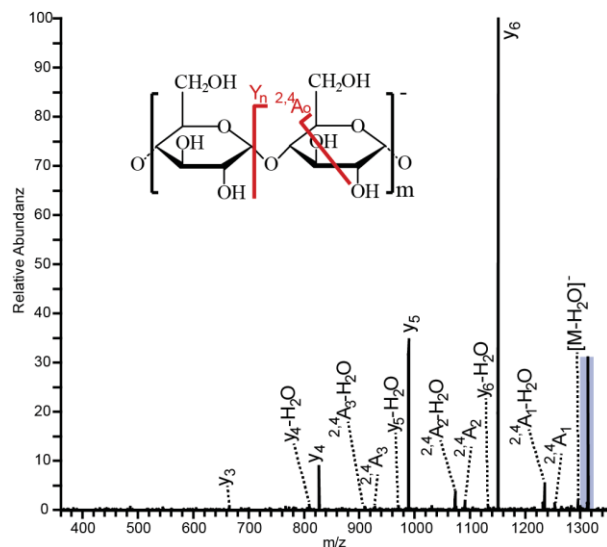
Abbildung 42. ESI-MS/MS-Spektren vom einfach negativ geladenen Dimer Glu-Glu. a) CID Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Fragmente sind schematisch dargestellt. Der Vergrößerungsfaktor ist angezeigt.

Im CID-Spektrum traten, wie erwartet, b- und y-Fragmente auf. Ansonsten konnten nur informationsarme Fragmente, wie der Wasserverlust, generiert werden. VUVID erzeugte hingegen eine Vielzahl verschiedener Fragmente. Das Dimer dissoziierte sowohl in a-, b-, x- und y-Fragmente, als auch in ein v-Fragment, welches den Seitenkettenverlust bezeichnet. Bei der Auswertung größerer Peptide, z.B. eines 13-mers, konnten jedoch die CID-Spektren im negativen Modus nicht aussagekräftig ausgewertet werden. Sie zeigten lediglich Wasser- und CO₂-Verluste. Das VUVID-Spektrum wies demgegenüber erneut eine große Fragmentvielfalt (Abbildung A14) auf. Somit könnte mit Hilfe von VUVID nun auch eine Sequenzierung von MS/MS-Peptidspektren im negativen Modus stattfinden. Die Problematik des positiven Ionenmodus lag darin, dass das VUV-Licht teilweise so effizient ionisierte, dass dabei ein intensiver Hintergrund entstand, welcher größtenteils aus Weichmachern stammte. Diese können aus den verwendeten Eppendorfgefäßen oder auch aus Übergangsstücken der Kapillaren stammen. Von daher konnten Spektren im positiven Modus zuverlässig nur ab m/z 400 aufwärts aufgenommen werden. Da bei Peptiden deutlich wurde, dass VUVID hier nicht im Vorteil gegenüber CID in Bezug auf die Fragmentvielfalt war (Abbildung A15), wurden alle weiteren Spektren wieder im negativen Ionenmodus aufgenommen.

Kohlenhydrate

Zunächst wurde ein 8-mer Maltodextrin mittels CID und VUV fragmentiert (Abbildung 43).

a) CID; Intensität: 2,04E1



b) VUV; Intensität: 2,75E1

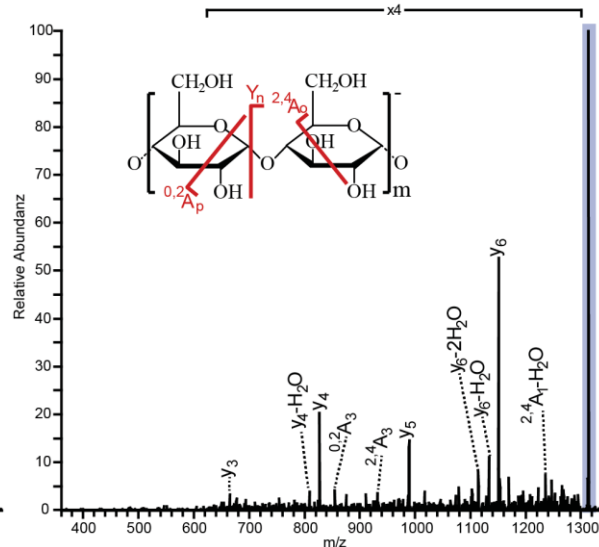


Abbildung 43. ESI-MS/MS-Spektren vom einfach negativ geladenen 8-mer Maltodextrin. a) CID-Spektrum bei 5 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Fragmente sind schematisch dargestellt. Der Vergrößerungsfaktor ist angezeigt.

CID erzeugte in diesem Versuch intensivere Fragmente, während bei VUVID das Vorläuferion das abundanteste Signal war. Bei beiden Methoden wurde eine Serie Y-Fragmente erzeugt (Benennung nach (66)). Weiterhin konnten in beiden Spektren eine Vielzahl von Wasserverlusten zugeordnet werden. Während bei CID nur der einfache Wasserverlust auftrat, konnte bei VUVID auch ein doppelter Wasserverlust beobachtet werden. Fragmente der Klasse $^{2,4}A_n$ wurden ebenfalls bei beiden gefunden, die Klasse $^{0,2}A_n$ konnte jedoch nur bei VUVID beobachtet werden. Außerdem wurde bei VUVID im Vergleich zu CID eine Vielzahl weiterer Fragmente erzeugt, welche nicht der typischen Zuordnung entsprechen. Zum weiteren Vergleich wurde ein Monomer Melezitose und ein Dimer Raffinose untersucht. Während die Melezitose in CID auch innerhalb der Zuckereinheit bricht, konnte diese Fragmentklasse in VUVID nicht beobachtet werden. In beiden Fällen ist die Abspaltung ganzer Zuckereinheiten, sowie ein Wasserverlust generiert worden (Abbildung A8). Andererseits zeigt das CID-Fragmentspektrum des Dimers der Raffinose nur das Monomer, während in VUVID eine Vielzahl verschiedener Fragmentklassen generiert wurde. Neben dem Monomer konnten hier auch Wasserverluste, sowie A- und X-Fragmente beobachtet werden. Ebenso konnte die Abspaltung einzelner Zuckereinheiten nachgewiesen werden (Abbildung A9). Neben dem Unterschied von Monomer und Dimer könnte auch die Sterik der Zucker ursächlich für das verschiedene Dissoziationsverhalten in VUVID sein.

Kleine Moleküle

Als nächstes wurden kleine Moleküle auf ihr Dissoziationsverhalten bezüglich VUVID getestet. Dabei hing die Effizienz des Prozesses stark von der Struktur des Moleküls ab. So konnte beispielsweise bei einem konjugierten π -Elektronensystem eine grössere Vielfalt der Dissoziationskanäle als bei CID festgestellt werden (Abbildung 44).

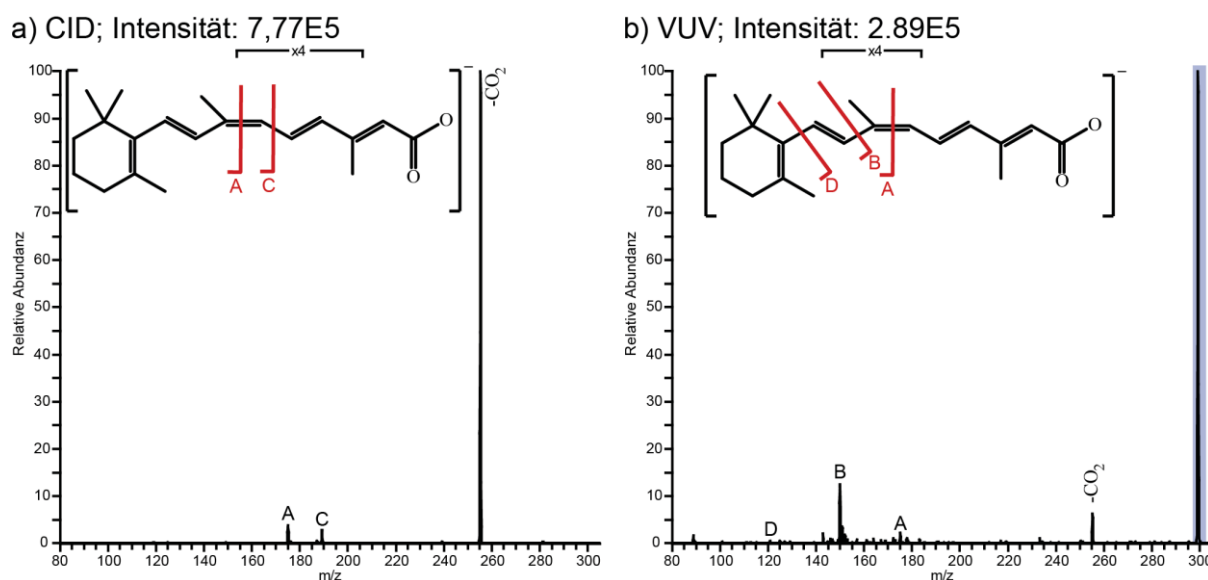


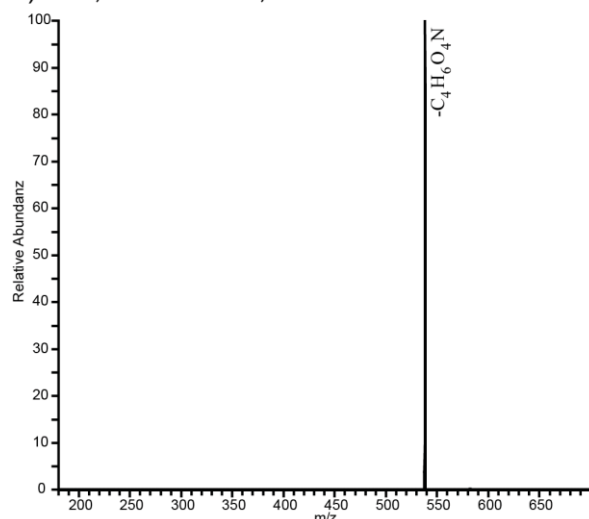
Abbildung 44. ESI-MS/MS-Spektren von der einfach negativ geladenen 9-cis Retinsäure. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Fragmente sind schematisch dargestellt. Der Vergrößerungsfaktor ist angezeigt.

Bei der Bestrahlung von 9-cis Retinsäure konnten mehr Bruchstellen als bei CID erzeugt werden. Im Gegensatz dazu konnten bei Molekülen ohne Doppelbindungen, wie Biotin und Natriumdodecylsulfat, zwar auch bei CID nur wenige Fragmente generiert werden, jedoch konnte mittels VUVID kein höherer Informationsgehalt erreicht werden (Abbildung A10/11).

Farbstoffe

Es konnte bereits gezeigt werden, dass VUVID eine gute Fragmentierungsmethode für große Moleküle ist und solche die Doppelbindungen enthalten. Von daher wurde diese Methode als nächstes an großen Komplexen, welche viele Doppelbindungen enthielten, getestet. In allen Fällen konnten informationsreiche Spektren mit vielen Fragmenten erhalten werden. Im Vergleich zu CID konnte dabei, wie im Beispiel von Xylenolorange, eine Vielzahl intensiver Signale beobachtet werden (Abbildung 45).

a) CID; Intensität: 9,47E3



b) VUVID; Intensität: 2,94E3

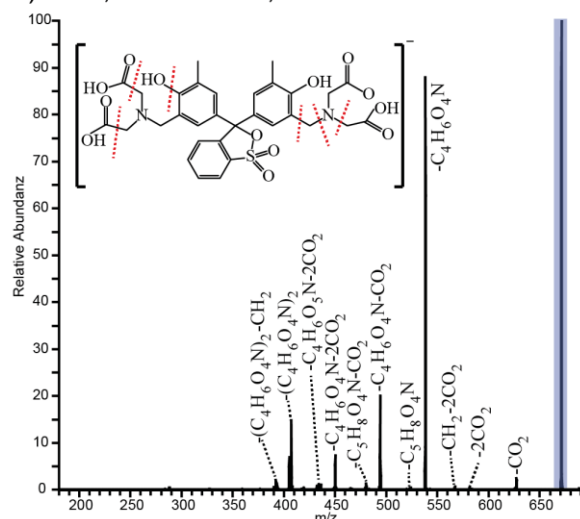


Abbildung 45. ESI-MS/MS-Spektren vom einfach negativ geladenen Xylenolorange. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Fragmente sind schematisch dargestellt.

Bei Xylenolorange wurde nur ein Fragment erzeugt, welches aus der Abspaltung eines Teils einer Seitenkette resultierte. VUVID hingegen erzeugte ein reichhaltiges Fragmentspektrum. Dabei konnte nicht nur der einfache Bruch der Seitenketten erzeugt werden, auch eine Abspaltung an beiden Seiten des Moleküls erfolgte, sowie der ein- und mehrfache CO_2 -Verlust. Außerdem entstanden Fragmente aus kombinierten Brüchen der Seitenketten an verschiedenen Stellen. Ähnliches konnte bei Chlorophyllin beobachtet werden (Abbildung A12). Während bei CID nur der einfache und doppelte CO_2 -Verlust entstand, konnten mittels VUVID Fragmente sowohl des dreifachen CO_2 -Verlustes, als auch eine Vielzahl Fragmente, welche auf Seitenkettenbrüche zurückzuführen waren, analysiert werden. Auch bei *meso*-Tetraphenylporphin-4,4',4'',4'''-tetrasulfonsäure konnte VUVID als Fragmentierungsmethode getestet werden, wobei das Spektrum dem von CID sehr ähnlich war (Abbildung A13).

Insgesamt konnte VUVID als neue Fragmentierungsmethode vorgestellt werden, welche sich insbesondere im negativen Modus sehr gut eignete, um Spektren von größeren Komplexen und Biopolymeren zu generieren. Diese Spektren wiesen im Vergleich zu CID einen wesentlich höheren Informationsgehalt auf. Dabei wurden sowohl typische Fragmente, wie beispielsweise w und d Fragmente bei Oligonukleotiden, aber auch untypische Brüche, wie v Fragmente bei der Spaltung von Peptidseitenketten, beobachtet. Insbesondere die Radikalbildung durch die Aufnahme und Abgabe von Elektronen kann eine bessere Ionisierung von schwer zugänglichen Fragmenten ermöglichen. Als komplementäre MS/MS Methode könnte VUVID, wie beim

Vergleich von HCD und CID, zusammen mit anderen MS/MS Methoden für einen höheren Informationsgehalt sorgen. Abhängig von der Stoffklasse besitzt VUVID das Potenzial, Methoden wie CID auch vollständig zu ersetzen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch eine Lampe mit einem polychromatischen Emissionsspektrum als MS/MS Methode dienen kann. Die Photonen waren ausreichend energiereich, so dass zur Verstärkung kein Laser benötigt wurde. Somit kann VUVID einfach und günstig gegebenenfalls auch nachgerüstet werden.

4. Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine umfassende Studie zur Untersuchung des Gasphasen- und Fragmentierungsverhaltens von Oligonukleotiden durchgeführt. Dabei wurde erstmalig umfassend auf die Dissoziation von DNA und LNA Doppelsträngen in CID eingegangen. Nachdem hier auch auf LNA Bezug genommen wurde, ist als nächster Schritt eine nähere Betrachtung auch anderer DNA-Analoga im Vergleich sinnvoll. Gerade Peptidnukleinsäuren (PNAs) wurden bislang nur oberflächlich massenspektrometrisch untersucht. Insbesondere Hybriddoppelstränge mit DNA könnten hier neue Erkenntnisse zu deren Stabilität liefern. Auch die Möglichkeit hochaufgelöste MS bzw. MS/MS einzusetzen, würde zu weiteren Erkenntnissen, wie die Unterscheidung verschiedener Fragmente mit sehr ähnlicher Masse, führen. Gerade bei der Analyse von Doppelstrangfragmenten, bei denen eine Vielzahl von Signalen sehr dicht beieinanderliegen, würde eine verbesserte Auflösung die Zuordnung deutlich erleichtern.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit erfolgreich eine neue VUV-basierte MS/MS-Technik etabliert werden. Im Vergleich zu den bereits bekannten Aktivierungsmethoden konnte gezeigt werden, dass VUVID in der Lage ist, ebenso aussagekräftige Fragmente zu bilden, sowie neue Dissoziationspfade zu generieren. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, mittels VUV durch Radikalbildung eine Nachionisierung zu erreichen und somit Chancen für die Analyse schwer zugänglicher Fragmente zu bieten. Diese können bislang oftmals nicht mittels MS/MS untersucht werden.

Generell notwendig wäre eine weitere Optimierung der Optik, um eine maximale Photonendichte, ohne Streulicht, in der Ionenfalle zu erreichen. Zwar konnten bereits inhaltsreiche Spektren verschiedener Analytklassen erhalten werden, jedoch waren noch lange Bestrahlzeiten von einigen Sekunden notwendig, um diese zu generieren. Mittels dünner MgF_2 Linsen und Blenden in optimaler Position sollte das VUV-Licht jedoch ausreichend fokussiert werden können, um diese Zeiten deutlich zu verringern. Dabei muss bedacht werden, dass kein monochromatisches Licht abgegeben wird. Zwar liegt das Emissionsmaximum bei ~ 160 nm, eine effizientere Fragmentierung könnte jedoch auch bei 115 nm, trotz geringer Emissionsintensität, erreicht werden. Weitere, umfangreiche Experimente sind daher notwendig, um die Vielzahl der Parameter zu optimieren. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass auch eine Lampe, statt eines Lasers, als effiziente MS/MS Methode dienen kann.

Anschließend sollte diese Aktivierungstechnik stärker mit der des MS verknüpft werden. Bislang wurde die Lampe manuell zugeschaltet, während die Ionen mittels Software mit einer relativen Kollisionsenergie von 0 % in der Ionenfalle gehalten wurden. Die Bestrahlung der gefangenen Ionen konnte hier zwischen einigen ms und 60 s variiert werden. Eine direkte Steuerung über die MS-Software würde den Vorteil bringen, die Ionen gezielt zu bestrahlen und ohne Bestrahlung auslesen zu lassen. Bislang werden die Ionen kontinuierlich bestrahlt, auch da die Lampe zunächst ca. 10 s benötigt, um eine konstante Leistung zu erreichen. Über einen ansteuerbaren Shutter beispielsweise könnten nur die isolierten Ionen für einige Zeit bestrahlt werden, während bei geschlossenem Shutter ausgelesen werden könnte. Zusätzlich könnten so weitere Erkenntnisse über VUV-aktivierte Reaktionen gewonnen werden.

Außerdem sollte diese Technik noch auf weitere Probenklassen systematisch angewendet werden. Es konnten bereits deutliche Unterschiede zu CID gezeigt werden. Insbesondere bei der Bestrahlung von Biopolymeren und doppelbindungsreichen Verbindungen konnte dabei eine höhere Fragmentausbeute erreicht werden. Dadurch kann ein deutlicher Informationsgewinn ermöglicht werden. In Kombination mit hochauflösenden Analysatoren wäre es dadurch möglich, die VUV-induzierten Vorgänge genauer zu untersuchen, um somit das vollständige Potenzial der Technik zu untersuchen.

Insgesamt konnte VUVID als eine Fragmentierungsmethode vorgestellt werden, welche kostengünstig und einfach nachgerüstet werden kann, und das Potenzial aufweist, Einzug in die Routineanalytik zu halten.

5. Abkürzungsverzeichnis

A	-	Adenin
BIRD	-	schwarzkörperstrahlungsinduzierte Dissoziation
C	-	Cytosin
CCS	-	Wirkungsquerschnitt
CID	-	kollisionsinduzierte Dissoziation
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
ESI	-	Elektrosprayionisation
FT-ICR	-	Fouriertransformations- Ionenzyklotronresonanz
G	-	Guanin
HCD	-	höher energetische kollisionsinduzierte Dissoziation
IM-MS	-	Ionenmobilitätsmassenspektrometer
IMS	-	Ionenmobilitätspektrometrie
IRMPD	-	Infrarot Multiphoton Dissoziation
LNA	-	<i>Locked Nucleic Acids</i>
MALDI	-	Matrix assistierte Laser Desorption/ Ionisation
mRNA	-	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
MS	-	Massenspektrometrie
QET	-	Quasi-Gleichgewichtstheorie
T	-	Thymin
TEA	-	Triethylamin
ToF	-	<i>Time-of-Flight</i>
VUV	-	Vakuum Ultraviolett
VUVID	-	Vakuum Ultraviolet induzierte Dissziation

6. Experimenteller Teil

6.1. Chemikalienliste

9-Cis-Retinsäure	-	Sigma-Aldrich ≥ 98 %
Acetonitril	-	J.T. Baker, HPLC Grade
Adenosintriphosphat	-	Sigma-Aldrich, 99 %
Ameisensäure	-	Fluka, p.a.
Ammoniumacetat	-	Roth, ≥ 97 % p.a.
Biotin	-	Sigma-Aldrich, 99 %
Chlorophyllin	-	Sigma-Aldrich
Glu-Glu	-	Sigma-Aldrich
Isopropanol	-	Chemsolute, 99,95 %
LNA	-	Eurogentec (Köln)
Lysozym	-	Roth
Maltodextrin 4-7	-	Sigma-Aldrich
Melezitose	-	Sigma-Aldrich, ≥ 99 %
Methanol	-	J.T. Baker, HPLC Grade
<i>m</i> -Tetraphenylporphine-4,4,4,4-sulfonsäure	-	Sigma-Aldrich, ≥ 98 %
Natriumdodekylsulfat	-	Roth, ≥ 99 %
Oligonukleotide	-	Metabion (Planegg), BioTez (Berlin)
Peptid TS SG/57	-	Festphasenpeptidsynthese der BAM
Raffinose	-	Sigma-Aldrich, ≥ 98 %
Stearinsäure	-	Sigma-Aldrich, 99 %
Triethylamin	-	Roth, $\geq 99,5$ %
Xylenolorange	-	Sigma-Aldrich,

6.2. Tandem-MS-Messungen

6.2.1. Oligonukleotide und andere Proben

Einzelsträngige DNA, sowie Proben für die VUV Versuche wurden stets in 30 % Methanol, 1 % Triethylamin (v/v) in einer Konzentration von 10 μ M gemessen. Zur Herstellung von

DNA- bzw. von LNA-Doppelsträngen wurden die Einzelstränge auf 10 μM in 20 % Isopropanol mit 0,2 % TEA (v/v) und 50 mM Ammoniumacetat verdünnt und 10 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben über mindestens 30 min langsam in einem Styroporblock auf Raumtemperatur abgekühlt.

6.2.2. LTQ

An der linearen Ionenfalle LTQ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) wurden ESI-MS-Messungen der DNA-Einzelstränge im negativen Modus durchgeführt. Die Messparameter wurden auf das Signal des siebenfach negativ geladenen Oligonukleotids 5'-AAA TTA TAA TTA GGC-3' optimiert. Die Parameter waren wie folgt: 100°C Transferkapillarentemperatur und 30 arbitrary units sheath gas flow. Die Proben wurden über Direktinfusion mit einem Fluss von 5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$ in das LTQ geführt. Für die CID-Experimente wurden die Vorläuferionen mit einer Isolationsbreite von $\Delta m/z$ 2 isoliert und eine Aktivierungszeit von 30 ms eingestellt. Die relative Kollisionsenergie wurde in 0,1 % Schritten variiert, bis die gewünschte Fragmentierung eintrat.

6.2.3. Synapt

Das Synapt G2-S HDMS (Waters Corporation, Manchester UK) wurde ebenso für die CID Fragmentierung genutzt. Die ESI spray voltage wurde auf 1,99 kV gesetzt, Quellentemperatur und Desolvatationtemperatur wurden auf 100 und 150°C gesetzt. Cone voltage und Quellen offset waren 40 V, LM und HM Auflösung: 17 für CID Experimente, Transfer Kollisionszelle blieb bei 4 V, während die Fallenkollisionszelle für die Aktivierung mittels Kollisionsenergie optimiert wurde, um eine maximale Intensität der Fragmentionen zu erreichen.

6.2.4. Orbitrap

Die ESI-MS-Messungen der 4-mere wurden in einer LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) durchgeführt. Die Messparameter wurden für jedes zu fragmentierende Signal optimiert. Die Parameter waren wie folgt: 100°C Transferkapillarentemperatur und 30 arbitrary units sheath gas flow. Die Proben wurden über Direktinfusion mit einem Fluss von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ in das LTQ geführt. Für die CID- und HCD-Experimente wurden die Vorläuferionen mit einer Isolationsbreite von $\Delta m/z$ 2 isoliert und eine

Aktivierungszeit von 30 ms eingestellt. Die Drücke innerhalb der Fallen für CID $1 \cdot 10^{-2}$ mbar und für HCD $2 \cdot 10^{-5}$ mbar.

6.3. IM-MS Messungen

Die IM-MS Messungen wurden in einem nach (96) modifizierten Synapt G2-S HDMS (Waters Corporation, Manchester, UK) durchgeführt. Es wurde eine nano ESI-Quelle mit typischerweise 3 μ L Probe in einer Platin-Palladium-beschichteten Borsilikat Nadel genutzt. Die Kapillarspannung betrug 0,9 kV; sampling cone Spannung, 25 V; source offset, 25 V; Quellentemperatur, 25°C; Kollisionsenergie, 2,0 V; Transferkollisionsenergie, 0 V; Ionenfallengasfluss, 2 mL/min. IMS gas, 1,8 Torr Helium; IMS Temperatur, 28°C, Ionenfallen DC Eingang, 4,6 V; Ionenfallen DC bias, 2,0 V; Ionenfallen DC, -9,0 V; Ionenfallen DC Ausgang, 6,6 V; IMS DC Eingang, -20,0 V; Heliumzellen DC, 45-85 V; Heliumausgang, -40,0 V; IMS bias, 60; Transfer DC Eingang, 5,0 V; Transfer DC Ausgang, 15,0 V; Ionenfallen Wellengeschwindigkeit, 222 m/s; Wellenhöhe, 6,0 V; Transfer Wellengeschwindigkeit, 400 m/s; Transfer Wellenhöhe, 10,0 V. Die IM-MS Spektren wurden im negativen Ionenmodus aufgenommen und die Driftzeiten wurden unter Benutzung der Mason-Schamp-Gleichung in Wirkungsquerschnitte umgerechnet.(87, 95, 148)

6.4. *High Brightness* VUV Lichteinheit

Für die VUV-Fragmentierung wurde eine Lampe der Firma Hamamatsu der Serie L10366 genutzt (Abbildung 46). Diese enthielt als Lichtquelle eine Deuteriumlampe mit einem Magnesiumfluoridfenster. Die Lampe wurde luftgekühlt und an ihrem Ende befand sich ein Vakuumflange. Das Lichtspektrum erreichte von 400 nm hin zu kleinen Wellenlängen bis zu 115 nm. Die externe Kontrolle ermöglichte ein einfaches Ein- und Ausschalten bei Bedarf. Die Bestrahlungsdauer der Ionen wurde über die Verweildauer innerhalb der Ionenfalle per Software gesteuert.



Abbildung 46. VUV-Lichtquelle mit Netzteil der Firma Hamamatsu.(147)

7. Anhang

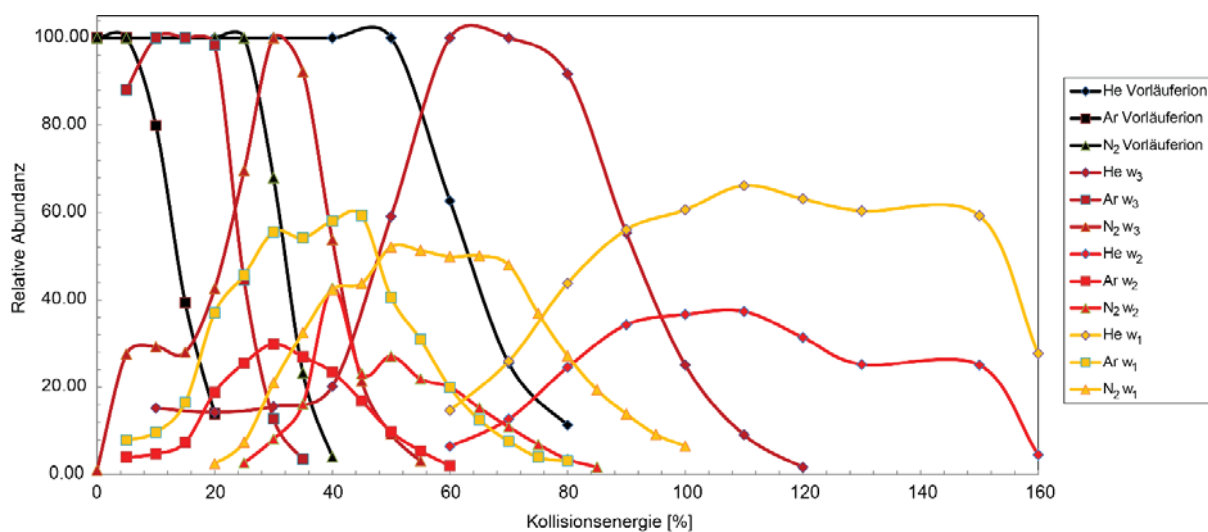


Abbildung A1. Ergebnisse des ESI-MS/MS-Experiments an 5'-ACTG-3' [M-3H]³⁺. Ausgewählte dominante Fragmente wurden mit ihrer Intensität im Spektrum gegen die entsprechende Kollisionsenergie aufgetragen. Dabei wurden drei verschiedene Kollisionsgase genutzt und verglichen (Ar, He, N₂).

Tabelle A1. Sequenzen aller untersuchten DNA-Oligonukleotide. Zusätzliche LNAs sind fett gedruckt. Fehlstellen sind gelb unterlegt.

Name	Basen	GC Anteil	Sequenz
CAGT	4	50 %	5'-CAGT-3'
AGTC	4	50 %	5'-AGTC-3'
GTCA	4	50 %	5'-GTCA-3'
TCAG	4	50 %	5'-TCAG-3'
ACTG	4	50 %	5'-ACTG-3'
CTGA	4	50 %	5'-CTGA-3'
TGAC	4	50 %	5'-TGAC-3'
GACT	4	50 %	5'-GACT-3'
AAAAA	5	100 %	5'-AAAAA-3'
8-mer 1	8	37,5 %	5'CGG ATT AA'3
8-mer 2	8	37,5 %	5'TTA ATC CG'3
10-mer 1	10	30 %	5'CGG ATT AAT A'3
10-mer2	10	30 %	5'TAT TAA TCC G'3

12-mer 1	12	25 %	5'CGG ATT AAT ATT'3
12-mer 2	12	25 %	5'AAT ATT AAT CCG'3
A1	15	0 %	5'-AAA TTA TAA TTA TAT-3'
A2	15	0 %	5'-ATA TAA TTA TAA TTT-3'
B1	15	20 %	5'-AAA TTA GGC TTA TAT-3'
B2	15	20 %	5'-ATA TAA GCC TAA TTT-3'
C1	15	20 %	5'-AAA TTA TAA TTA GGC-3'
C2	15	20 %	5'-GCC TAA TTA TAA TTT-3'
D1	15	40 %	5'-AAA TAA GGC CGC TAT-3'
D2	15	40 %	5'-ATA GCG GCC TTA TTT-3'
E1	15	40 %	5'-GGC TAA TAA TTT CGC-3'
E2	15	40 %	5'-GCG AAA TTA TTA GCC-3'
F1	15	60 %	5'-GGC TAA CGC ATA GGC-3'
F2	15	60 %	5'-GCC TAT GCG TTA GCC-3'
G1	15	80 %	5'-GGG TTA GCC GGC GCG-3'
G2	15	80 %	5'-CGC GCC GGC TAA CCC-3'
H1	15	100 %	5'-GGG CCG GCC GGC GCG-3'
H2	15	100 %	5'-CGC GCC GGC CGG CCC-3'
F3	15		5'-GCC TAT G()G TTA GCC-3'
F4	15		5'-GCC TA() GCG TTA GCC-3'
F5	15		5'-()CC TAT GCG TTA GCC-3'
F6	15		5'-GCC T()T GCG TTA GC()-3'
F7	15		5'-GCC TAT GAG TTA GCC-3'
F8	15		5'-GCC TAT GCG GTA GCC-3'
F9	15		5'-TCC TAT GCG TTA GCC-3'
F10	15		5'-GCC TAT ACG TTA GTTC-3'
C1rev	15	20 %	5'-CGG ATT AAT ATT AAA-3'
C2rev	15	20 %	5'-TTT AAT ATT AAT CCG-3'

24	17 %	5'-GTT TGA AAT TCA AAT ATA TTT TAG-3'
24	25 %	5'-TCA GCT AAA AAA GGT AAA GTA ATT-3'
24	42 %	5'-ATG ACC CTG TAA TAC TTC AGA GCA-3'
24	54 %	5'-CGG TGC GGG CCT TCC AAA AAC ATT-3'
24	67 %	5'-GCG CTC ACA AGC CTG GGG TGC CTA-3'
32 3'	25 %	5'-ATG GTT TAT GTC ACA ATC AAT AGA TAT TAA AC-
32	34 %	5'-TTC ATA ATC CCC TTA TTA GCG TTT TTC TTA CC-3'
32	44 %	5'-AGC GTC ATG TCT CTG AAT TTA CCG ACT ACC TT-3'
32 3'	56 %	5'-CCG GAA CCC AGA ATG GAA AGC GCA ACA TGG CT-
32 3'	63 %	5'-CCT TGA GTC AGA CGA TTG GCC TTG CGC CAC CC-
40 ATT	20 %	5'-AAA ACA AAA TTA ATT AAA TGG AAA CAG TAC AGT GAA T-3'
40	30 %	5'-TTG ACG AGC ACG TAT ACT GAA ATG GAT TAT TTA ATA AAA G-3'
40 AGC	40 %	5'-GTC AGA GGG TAA TTG ATG GCA ACA TAT AAA GAT TGA G-3'
40 CGC	50 %	5'-CGC CAA AAG GAA TTA CAG TCA GAA GCA AAG AGG TCA G-3'
40 TCAT	60 %	5'-TAG AGC TTG ACG GGG AGT TGC AGC AAG CGG TGG GCG-3'

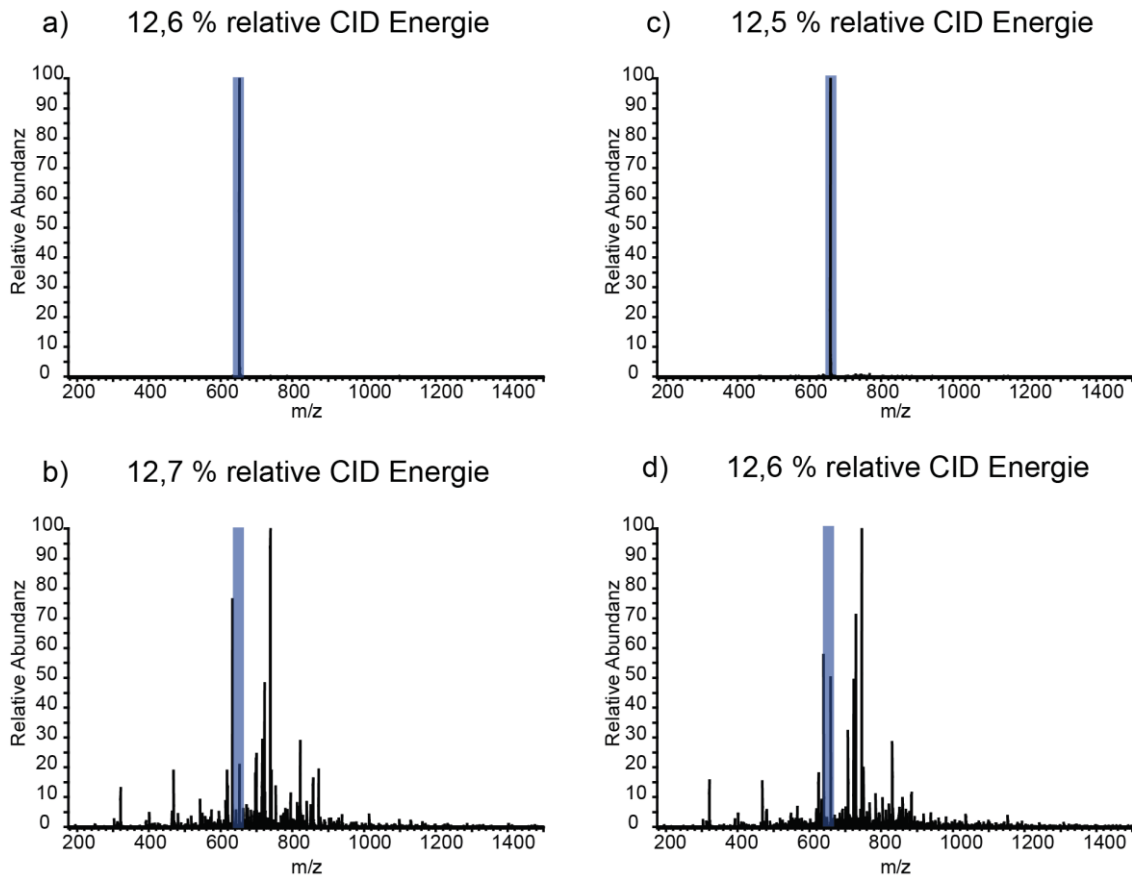


Abbildung A2. ESI-MS/MS-Spektren des siebenfach negativ geladenen Oligonukleotids 5'-AAA TTA TAA TTA TAT -3'. a) Isoliertes Vorläuferion m/z 652,2 bei einer Kollisionsenergie von 12,6 %. b) Isoliertes Vorläuferion m/z 652,2 bei einer Kollisionsenergie von 12,7 %. c) Isoliertes Vorläuferion m/z 658,6 (enthält zwei Natriumionen) bei einer Kollisionsenergie von 12,5 %. d) Isoliertes Vorläuferion m/z 658,6 (enthält zwei Natriumionen) bei einer Kollisionsenergie von 12,6 %. Das Vorläuferion ist immer in blau markiert.

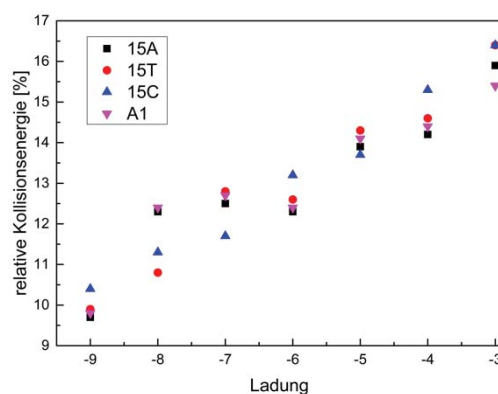


Abbildung A3. Fragmentierungspunkt von vier verschiedenen 15-meren. Drei bestehen ausschließlich aus jeweils 15 Adenin-, 15 Cytosin- oder 15 Thyminmonomeren, das 15-mer A1 wurde zum Vergleich mit aufgetragen.

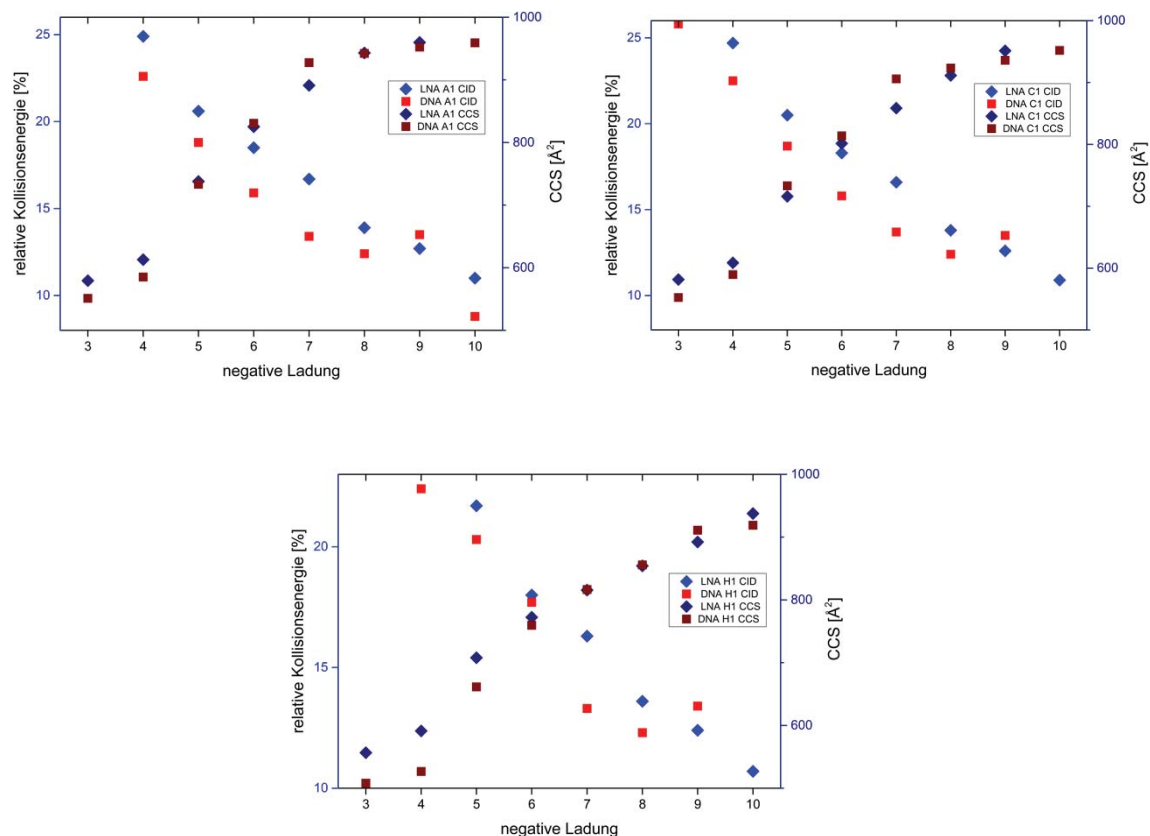


Abbildung A4. Korrelation zwischen der zur Fragmentierung benötigten Kollisionsenergie und der CCS jedes Ladungszustandes je eines DNA und eines LNA 15-mers (Strang A1 Oben links, Strang C1 Oben rechts, Strang H1 unten)

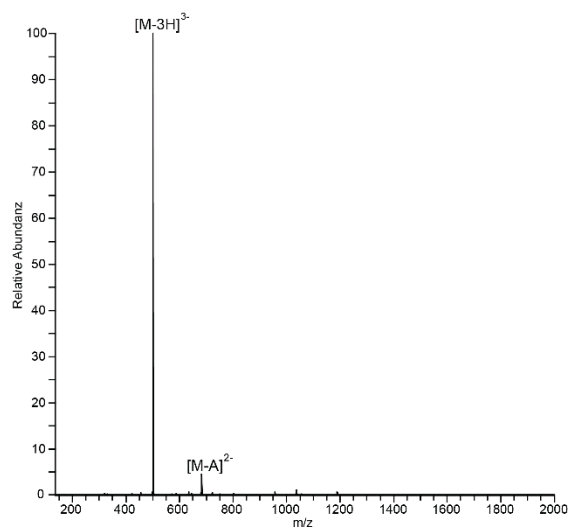


Abbildung A5. ESI-MS/MS-Spektrum des 5-mers 5'-AAAAA-3' im Ladungszustand 3- bei einer CID-Kollisionsenergie von 9 % und einer Aktivierungszeit in der Ionenfalle von 10 ms.

Tabelle A2. Zuordnung der Einzelstrangfragmente und Doppelstrangfragmente des 8-mer Doppelstrangs der Ladungszustände 5-, 4- und 3-. Fragmente des Einzelstrangs 8-mer 1 sind blau, die des Strangs 8-mer 2 rot

dargestellt. Bei den Doppelsträngen bedeuten 1 und 2, dass der jeweilige Strang vollständig vorhanden ist, während beim komplementären Strang ein Bruch stattfand.

Einzelstrangfragment		Doppelstrangfragment	
1	$[x_2-C]^-/[c_2-C]^-$	a	$[1+a_6-G]^{3-}/[2+z_6-G]^{3-}$
2	$[d_4-A]^{2-}/[w_4-A]^{2-}$	b	$[2+z_6]^{3-}/[1+b_6]^{3-}$
3	$[w_4]^{2-}$	c	$[2+w_6]^{3-}/[1+d_6]^{3-}$
4	$[d_2]^-/[d_4]^{2-}/[x_2]^-/[w_4]^{2-}$	d	$[2+b_7-G]^{3-}/[2+a_7-A]^{3-}/[1+b_7-A]^{3-}$
5	$[w_2]^-/[d_2]^-$	e	$[2+z_7-G]^{3-}/[1+y_7-G]^{3-}/[1+z_7-A]^{3-}/[1+a_7-C]^{3-}$
6	$[x_5-A]^{2-}/[c_5-G]^{2-}/[c_5-T]^{2-}/[a_3-A]^-/[x_5-C]^{2-}$	f	$[2+b_7-T]^{3-}/[1+y_7-A]^{3-}$
7	$[z_3-C]^-/[a_3-G]^-$	g	$[2+w_7-G]^{3-}/[2+x_7-A]^{3-}/[2+c_7-C]^{3-}/[1+w_7-A]^{3-}/[1+d_7-C]^{3-}$
8	$[M-A]^{3-}$	h	$[2+w_7-A]^{3-}/[2+d_7-C]^{3-}/[1+a_7]^{3-}$
9	$[M-A]^{3-}$	i	$[2+w_7-C]^{3-}/[1+z_7]^{3-}$
10	$[a_6-C]^{2-}/[a_6-G]^{2-}$	j	$[1+y_7]^{3-}/[M-2G]^{3-}$
11	$[w_6-A]^{2-}$	k	$[M-A-G]^{3-}$
12	$[w_6]^{2-}/[c_3]^-$	l	$[M-2A]^{3-}$
13	$[a_7-A]^{2-}$	m	$[1+c_7]^{3-}/[M-G-C]^{3-}$
14	$[a_4-A]^-/[z_4-A]^-$	n	$[2+w_7]^{3-}$
15	$[a_4-A]^-$	o	$[M-G-H_2O]^{3-}$
16	$[c_4-A]^-/[x_4-A]^-$	p	$[M-G]^{3-}$
17	$[M-G]^{2-}$	q	$[M-A]^{3-}$
18	$[y_4]^-/[c_4-C]^-$	r	$[M-C]^{3-}$
19	$[w_4]^-$		
20	$[d_4]^-/[w_4]^-$		
21	$[x_5-G]^-/[a_5-C]^-$		
22	$[w_5]^-$		
23	$[a_6-C]^-$		
24	$[M-A]^{2-}$		
25	$[w_5]^-$		

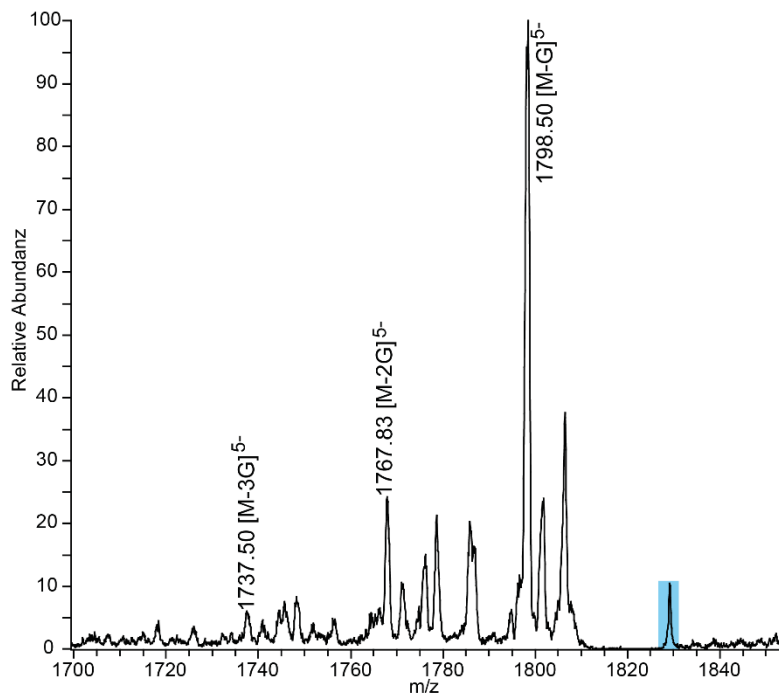


Abbildung A6. ESI-MS/MS-Spektrum des Doppelstrangs 5'-GGG TTA GCC GGC GCG-3'/5'-CGC GCC GGC TAA CCC-3' im m/z Bereich von 1700-1850. Das Vorläuferion ist blau hinterlegt, der einfache, zweifache und dreifache Guaninverlust ist dargestellt.

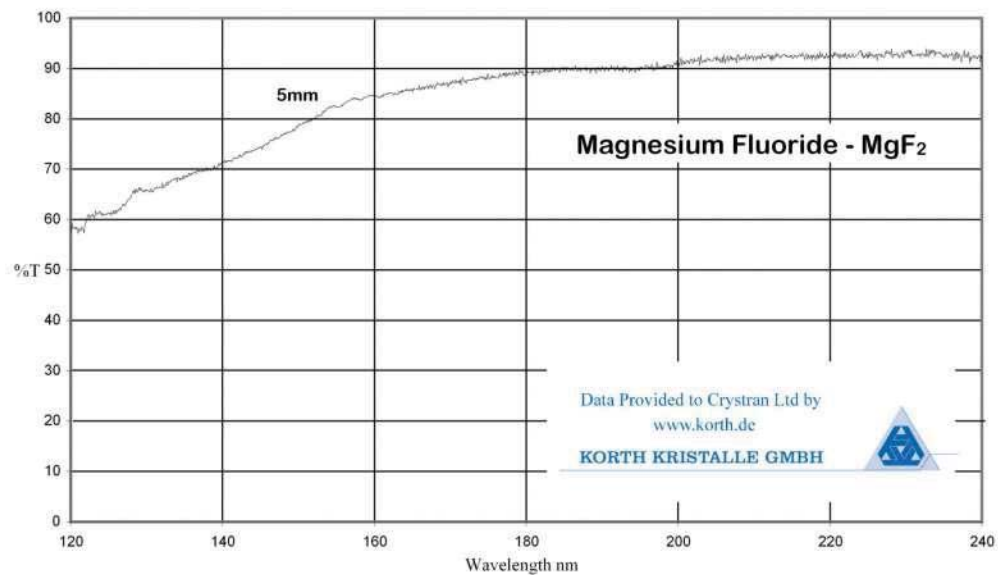
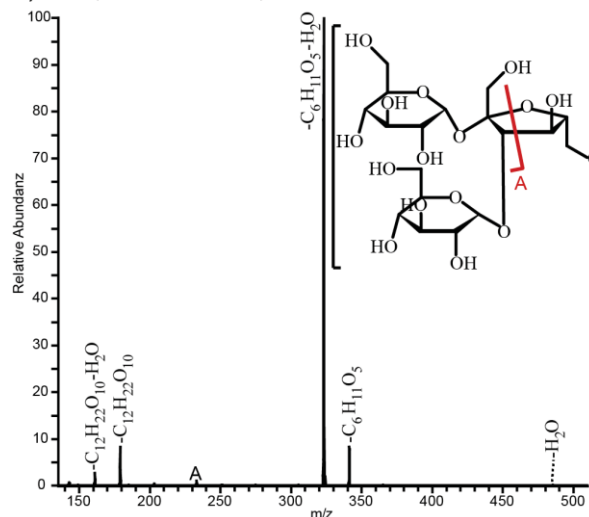


Abbildung A7. Emissionsspektrum von MgF_2 . (149)

a) CID; Intensität: 4,16E4



b) VUV; Intensität: 5,47E4

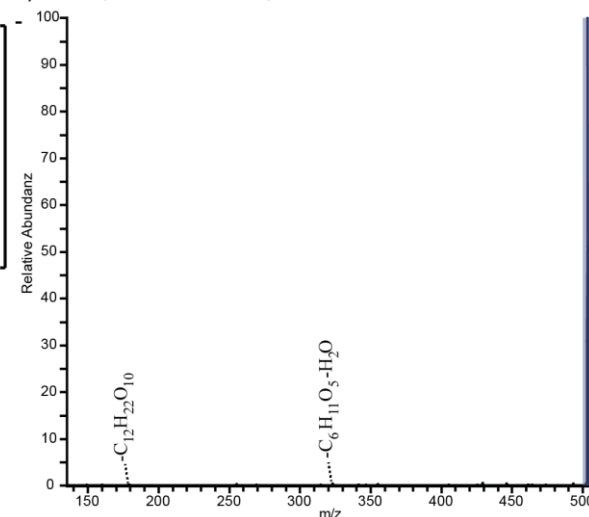
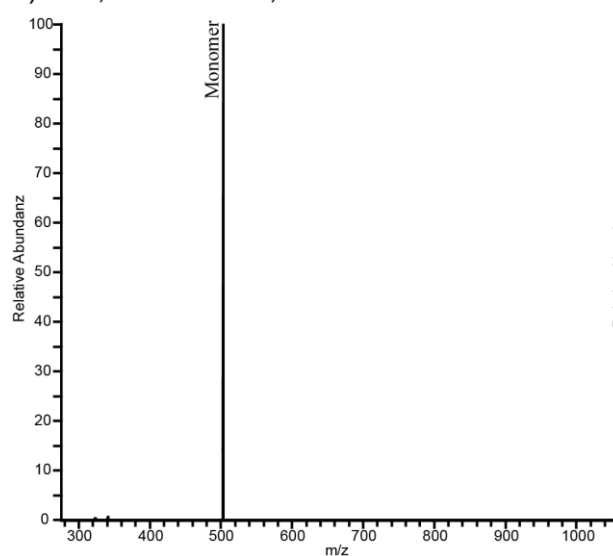


Abbildung A8. ESI-MS/MS-Spektren von einfach negativ geladener monomerer Melezitose. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Fragmente sind schematisch dargestellt.

a) CID; Intensität: 5,95E2



b) VUV; Intensität: 2,45E2

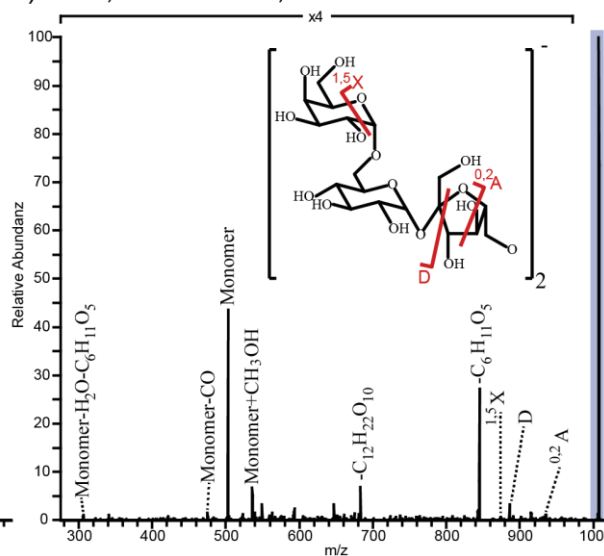
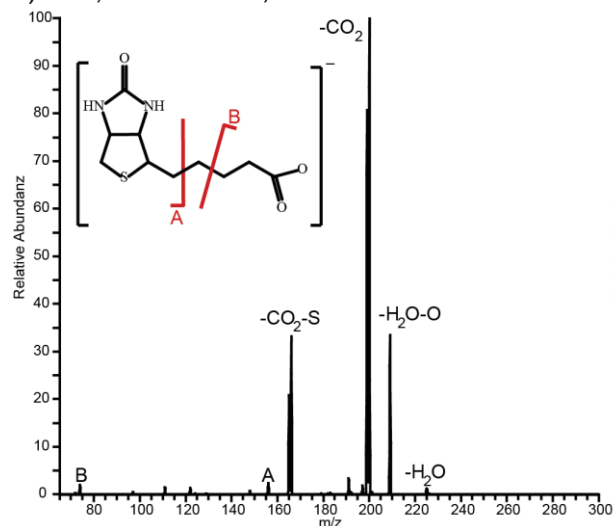


Abbildung A9. ESI-MS/MS- Spektren von einfach negativ geladener dimerer Raffinose. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Fragmente sind schematisch dargestellt. Der Vergrößerungsfaktor ist angezeigt.

a) CID; Intensität: 9,04E4



b) VUV; Intensität: 3,21E5

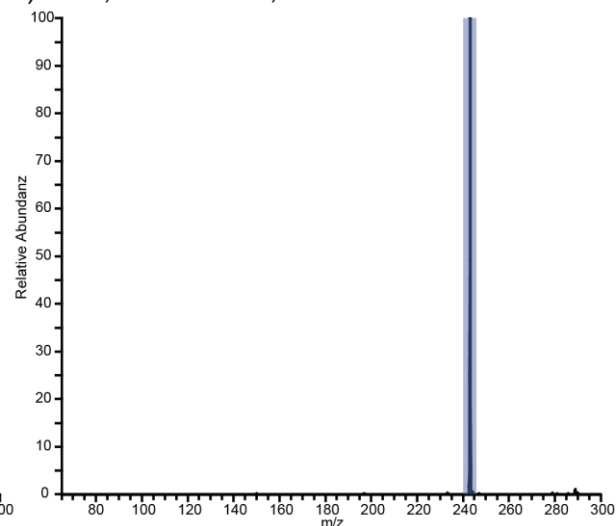
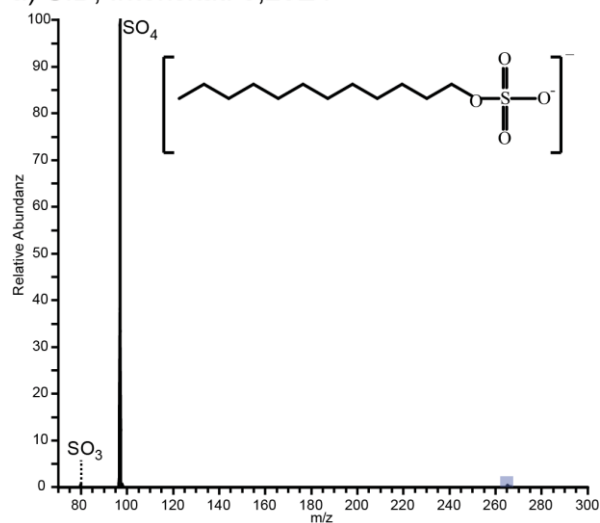


Abbildung A10. ESI-MS/MS-Spektren vom einfach negativ geladenen Biotin. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Fragmente sind schematisch dargestellt.

a) CID; Intensität: 5,28E4



b) VUV; Intensität: 2,66E5

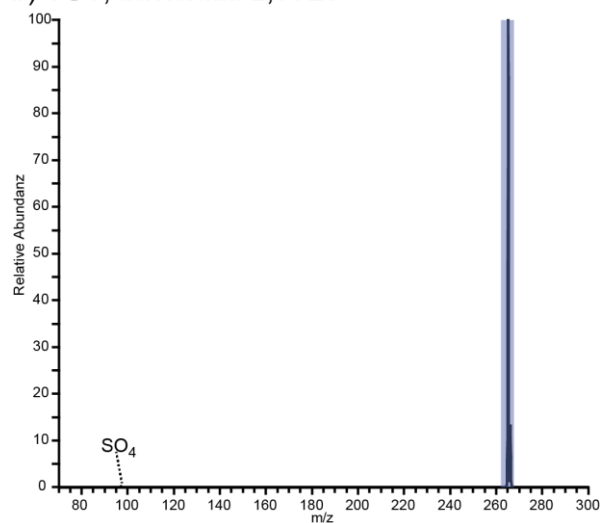
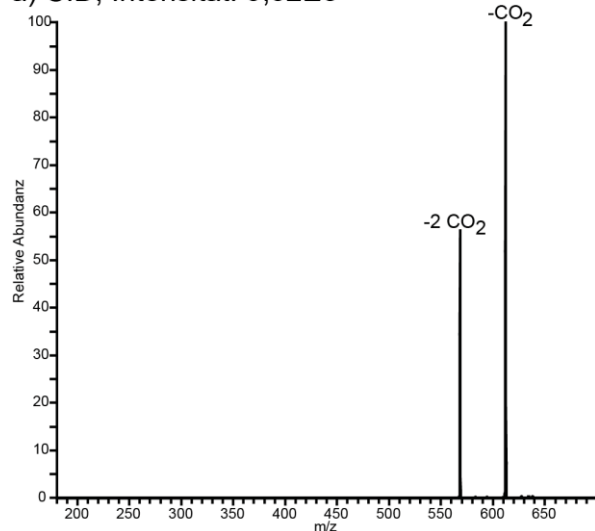


Abbildung A11. ESI-MS/MS-Spektren vom einfach negativ geladenen Natriumdodecylsulfat. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Fragmente sind schematisch dargestellt.

a) CID; Intensität: 9,92E3



b) VUV; Intensität: 2,79E3

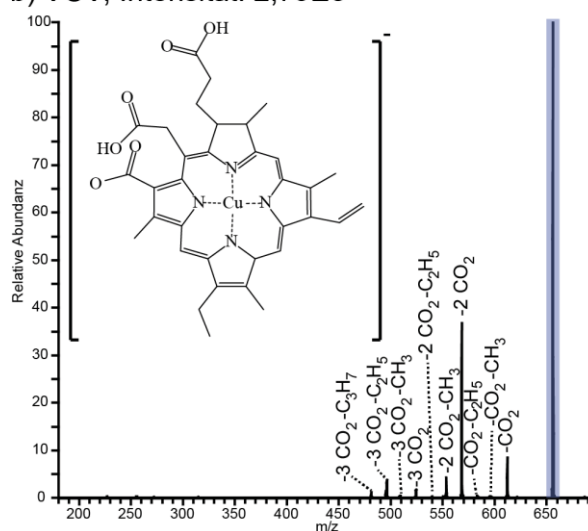
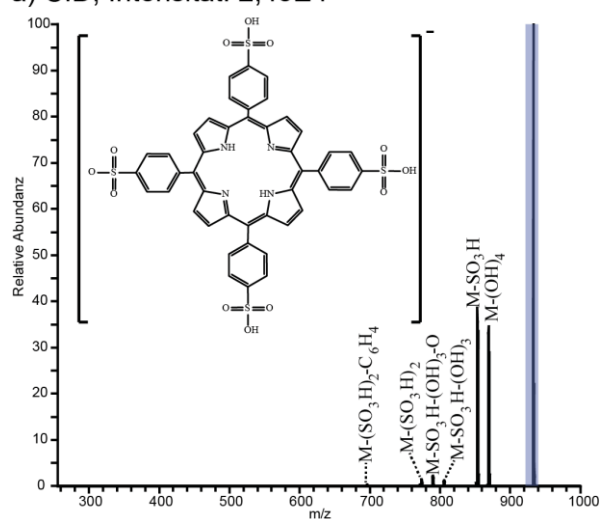


Abbildung A12. ESI-MS/MS-Spektren vom einfach negativ geladenen Chlorophyllin. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt.

a) CID; Intensität: 2,48E4



b) VUV; Intensität: 1,57E4

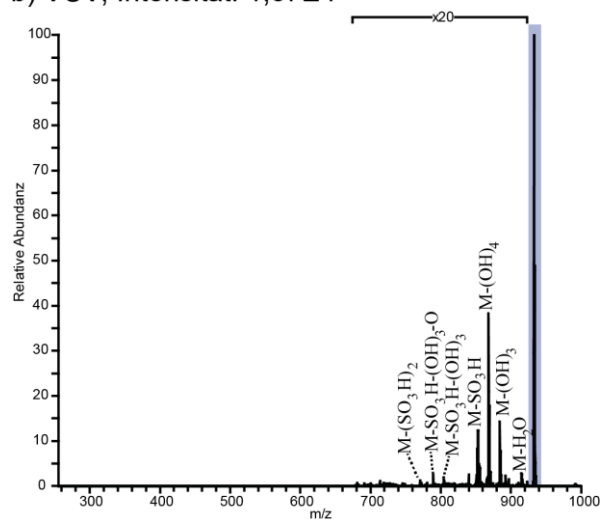
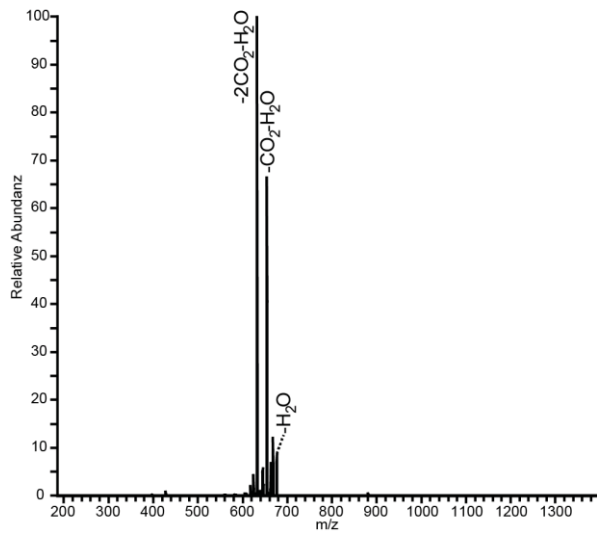


Abbildung A13. ESI-MS/MS-Spektren vom einfach negativ geladenen *meso*-Tetraphenylporphyrin-4,4',4'',4'''-tetrasulfonsäure. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Der Vergrößerungsfaktor ist angezeigt.

a) CID; Intensität: 2,45E4



b) VUV; Intensität: 3,83E3

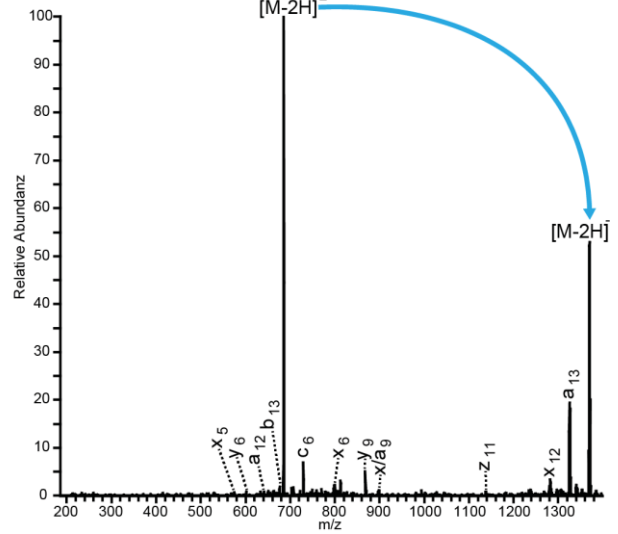
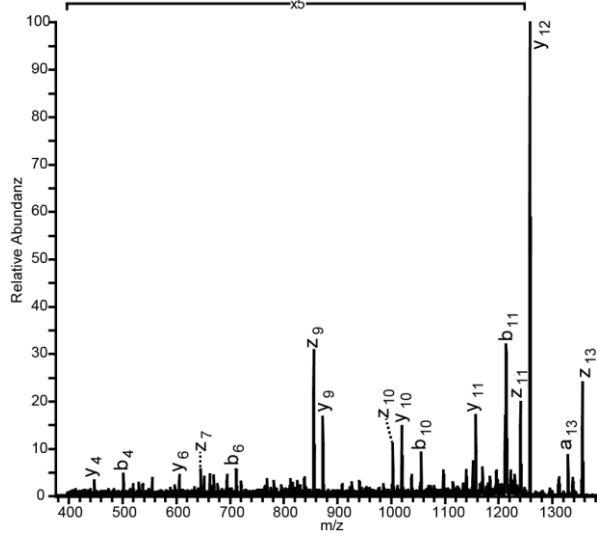


Abbildung A14. ESI-MS/MS-Spektren des zweifach negativ geladenen Peptids $\text{NH}_2\text{-DTHFPIGGTERSG-CONH}_2$. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s.

a) CID; Intensität: 1,87E4



b) VUV; Intensität: 5,32E4

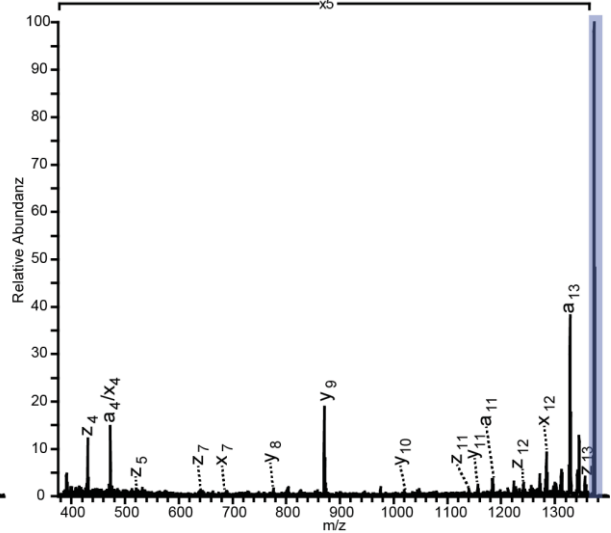


Abbildung A15. ESI-MS/MS-Spektren des einfach positiv geladenen Peptids $\text{NH}_2\text{-DTHFPIGGTERSG-CONH}_2$. a) CID-Spektrum bei 35 % relativer Kollisionsenergie. b) VUVID-Spektrum bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s. Das Vorläuferion ist blau unterlegt. Der Vergrößerungsfaktor ist angezeigt.

8. Literaturverzeichnis

1. <https://www.nature.com/search?q=mass+spectrometry> (letzter Zugriff 13.3.2018).
2. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
3. Berkenkamp S, Kirpekar F, Hillenkamp F. Infrared MALDI mass spectrometry of large nucleic acids. *Science*. 1998;281(5374):260-2.
4. McLafferty FW. Trends in analytical instrumentation. *Science*. 1984;226(4672):251-3.
5. McLafferty FW. Tandem mass spectrometry. *Science*. 1981;214(4518):280-7.
6. Happ GP, Stewart DW. Rearrangement Peaks in the Mass Spectra of Certain Aliphatic Acids. *J Am Chem Soc*. 1952;74(17):4404-8.
7. Gilpin JA, McLafferty FW. Mass Spectrometric Analysis - Aliphatic Aldehydes. *Analytical Chemistry*. 1957;29(7):990-4.
8. McLafferty FW. Mass Spectrometric Analysis - Molecular Rearrangements. *Analytical Chemistry*. 1959;31(1):82-7.
9. Schwarz G. MeCAT-IA – Ein neuartiges Reagenz zur molekular- und elementmassenspektrometrischen Quantifizierung von Proteinen Dissertation. 2013.
10. Holmes JL. Assigning Structures to Ions in the Gas-Phase. *Org Mass Spectrom*. 1985;20(3):169-83.
11. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods*. 2007;4(9):709-12.
12. Olsen JV, de Godoy LMF, Li GQ, Macek B, Mortensen P, Pesch R, et al. Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(12):2010-21.
13. Woodin RL, Bomse DS, Beauchamp JL. Multi-Photon Dissociation of Molecules with Low-Power Continuous Wave Infrared-Laser Radiation. *J Am Chem Soc*. 1978;100(10):3248-50.
14. Rosenstock HM, Wallenstein MB, Wahrhaftig AL, Eyring H. Absolute Rate Theory for Isolated Systems and the Mass Spectra of Polyatomic Molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1952;38(8):667-78.
15. Rosenstock HM, Wallenstein MB, Wahrhaftig AL, Eyring H. Absolute Rate Theory for Isolated Systems and the Mass Spectra of Polyatomic Molecules. *P Natl Acad Sci USA*. 1952;38(8):667-78.
16. Lorquet JC. Landmarks in the theory of mass spectra. *Int J Mass Spectrom*. 2000;200(1-3):43-56.
17. Bohme DK, Mackay GI. Bridging the Gap between the Gas-Phase and Solution - Transition in the Kinetics of Nucleophilic Displacement-Reactions. *J Am Chem Soc*. 1981;103(4):978-9.
18. Speranza M. Gas-Phase Ion Chemistry Versus Solution Chemistry. *Int J Mass Spectrom*. 1992;118:395-447.
19. Shalashilin DV, Thompson DL. Intrinsic non-RRK behavior: Classical trajectory, statistical theory, and diffusional theory studies of a unimolecular reaction. *J Chem Phys*. 1996;105(5):1833-45.
20. Lifshitz C. Recent Developments in Applications of Rrkm-Qet. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1992;118:315-37.
21. Elder JF, Beynon JH, Cooks RG. Kinetic-Energy Release in Metastable Ion Transitions - Study by Ion Kinetic-Energy Spectrometry and Rrkm Theory. *Org Mass Spectrom*. 1975;10(4):273-88.
22. Rosenstock HM. Measurement of Ionization and Appearance Potentials. *Int J Mass Spectrom*. 1976;20(2-3):139-90.

23. Levsen K, Schwarz H. Collisional Activation Mass-Spectrometry - New Probe for Determining Structure of Ions in Gas-Phase. *Angew Chem Int Edit.* 1976;15(9):509-19.
24. McLafferty FW, Bente PF, Kornfeld R, Tsai SC, Howe I. Collisional Activation Spectra of Organic Ions. *J Am Chem Soc.* 1973;95(7):2120-9.
25. Yost RA, Enke CG, McGilvery DC, Smith D, Morrison JD. High-Efficiency Collision-Induced Dissociation in an Rf-Only Quadrupole. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* 1979;30(2):127-36.
26. Ickert S, Riedel J, Beck S, Linscheid MW. Negative nucleotide ions as sensitive probes for energy specificity in collision-induced fragmentation in mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp.* 2018;32(7):597-603.
27. Weber R, Borchers F, Levsen K, Rollgen FW. Collisional Activation Spectra of Quaternary Phosphonium and Tertiary Sulfonium Cations Produced by Field Desorption. *Z Naturforsch A.* 1978;33(5):540-8.
28. Levsen K, Schwarz H. Gas-Phase Chemistry of Collisionally Activated Ions. *Mass Spectrom Rev.* 1983;2(1):77-148.
29. Bordasnagy J, Jennings KR. Collision-Induced Decomposition of Ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* 1990;100:105-31.
30. McLuckey SA. Principles of Collisional Activation in Analytical Mass-Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr.* 1992;3(6):599-614.
31. Shukla AK, Futrell JH. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *Journal of Mass Spectrometry.* 2000;35(9):1069-90.
32. Olsen JV, de Godoy LM, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, et al. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(12):2010-21.
33. <http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#.Wt3sDsiFM2w> (letzter Zugriff 19.3.2018)
34. McLafferty FW, Rogerson P, Venkataraghavan R, Michnowicz JA, Giessner BG. Signal Enhancement in Real-Time for High-Resolution Mass-Spectral. *Analytical Chemistry.* 1972;44(14):2282-+.
35. Lopez LL, Tiller PR, Senko MW, Schwartz JC. Automated strategies for obtaining standardized collisionally induced dissociation spectra on a benchtop ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Sp.* 1999;13(8):663-8.
36. Johnson JV, Yost RA, Kelley PE, Bradford DC. Tandem-in-Space and Tandem-in-Time Mass-Spectrometry - Triple Quadrupoles and Quadrupole Ion Traps. *Analytical Chemistry.* 1990;62(20):2162-72.
37. Nagaraj N, D'Souza RCJ, Cox J, Olsen JV, Mann M. Feasibility of Large-Scale Phosphoproteomics with Higher Energy Collisional Dissociation Fragmentation. *J Proteome Res.* 2010;9(12):6786-94.
38. McLuckey SA, Vaidyanathan G. Charge state effects in the decompositions of single-nucleobase oligonucleotide polyanions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* 1997;162(1-3):1-16.
39. Wu J, McLuckey SA. Gas-phase fragmentation of oligonucleotide ions. *Int J Mass Spectrom.* 2004;237(2-3):197-241.
40. Brodbelt JS. Photodissociation mass spectrometry: new tools for characterization of biological molecules. *Chem Soc Rev.* 2014;43(8):2757-83.
41. Hakansson K, Cooper HJ, Emmett MR, Costello CE, Marshall AG, Nilsson CL. Electron capture dissociation and infrared multiphoton dissociation MS/MS of an N-glycosylated tryptic peptide to yield complementary sequence information. *Analytical Chemistry.* 2001;73(18):4530-6.

42. Little DP, Speir JP, Senko MW, Oconnor PB, McLafferty FW. Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply-Charged Ions for Biomolecule Sequencing. *Analytical Chemistry*. 1994;66(18):2809-15.
43. Watson CH, Baykut G, Eyler JR. Laser Photodissociation of Gaseous-Ions Formed by Laser Desorption. *Analytical Chemistry*. 1987;59(8):1133-8.
44. Eyler JR. Infrared Multiple Photon Dissociation Spectroscopy of Ions in Penning Traps. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(3):448-67.
45. Brodbelt JS, Wilson JJ. Infrared Multiphoton Dissociation in Quadrupole Ion Traps. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(3):390-424.
46. Hashimoto Y, Hasegawa H, Waki L. High sensitivity and broad dynamic range infrared multiphoton dissociation for a quadrupole ion trap. *Rapid Commun Mass Sp*. 2004;18(19):2255-9.
47. Senko MW, Speir JP, McLafferty FW. Collisional Activation of Large Multiply-Charged Ions Using Fourier-Transform Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1994;66(18):2801-8.
48. Keller KM, Brodbelt JS. Collisionally activated dissociation and infrared multiphoton dissociation of oligonucleotides in a quadrupole ion trap. *Anal Biochem*. 2004;326(2):200-10.
49. Aaserud DJ, Guan ZQ, Little DP, McLafferty FW. DNA sequencing with blackbody infrared radiative dissociation of electrosprayed ions. *Int J Mass Spectrom*. 1997;167:705-12.
50.

<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAEGAAPFADBM>
BHQ(letzter Zugriff 9.5.2018).
51. Deutsches Institut für Normung (Hrsg.): Strahlungsphysik im optischen Bereich und Lichttechnik; Benennung der Wellenlängenbereiche. DIN 5031 Teil 7 J.
52. Bowers WD, Delbert SS, Hunter RL, Mciver RT. Fragmentation of Oligopeptide Ions Using Ultraviolet-Laser Radiation and Fourier-Transform Mass-Spectrometry. *J Am Chem Soc*. 1984;106(23):7288-9.
53. Kim TY, Thompson MS, Reilly JP. Peptide photodissociation at 157 nm in a linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Sp*. 2005;19(12):1657-65.
54. Barbacci DC, Russell DH. Sequence and side-chain specific photofragment (193 nm) ions from protonated substance P by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr*. 1999;10(10):1038-40.
55. Hettick JM, McCurdy DL, Barbacci DC, Russell DH. Optimization of sample preparation for peptide sequencing by MALDI-TOF photofragment mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2001;73(22):5378-86.
56. Reilly JP. Ultraviolet Photofragmentation of Biomolecular Ions. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(3):425-47.
57. Hunt DF, Shabanowitz J, Yates JR. Peptide Sequence-Analysis by Laser Photodissociation Fourier-Transform Mass-Spectrometry. *J Chem Soc Chem Comm*. 1987(8):548-50.
58. Hunt DF, Shabanowitz J, Yates JR, Griffin PR, Zhu NZ. Tandem Quadrupole Fourier-Transform Mass-Spectrometry. *Anal Chim Acta*. 1989;225(1):1-10.
59. Moon JH, Yoon SH, Kim MS. Photodissociation of singly protonated peptides at 193 nm investigated with tandem time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp*. 2005;19(22):3248-52.
60. Madsen JA, Boutz DR, Brodbelt JS. Ultrafast Ultraviolet Photodissociation at 193 nm and its Applicability to Proteomic Workflows. *J Proteome Res*. 2010;9(8):4205-14.

61. Shaw JB, Li WZ, Holden DD, Zhang Y, Griep-Raming J, Fellers RT, et al. Complete Protein Characterization Using Top-Down Mass Spectrometry and Ultraviolet Photodissociation. *J Am Chem Soc.* 2013;135(34):12646-51.
62. Brunet C, Antoine R, Dugourd P, Canon F, Giuliani A, Nahon L. Photo-induced electron detachment of protein polyanions in the VUV range. *J Chem Phys.* 2013;138(6):064301.
63. Larraillet V, Vorobyev A, Brunet C, Lemoine J, Tsybin YO, Antoine R, et al. Comparative dissociation of peptide polyanions by electron impact and photo-induced electron detachment. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010;21(4):670-80.
64. Gabelica V, Tabarin T, Antoine R, Rosu F, Compagnon I, Broyer M, et al. Electron photodetachment dissociation of DNA polyanions in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Anal Chem.* 2006;78(18):6564-72.
65. Larraillet V, Antoine R, Dugourd P, Lemoine J. Activated-electron photodetachment dissociation for the structural characterization of protein polyanions. *Anal Chem.* 2009;81(20):8410-6.
66. Domon B, Costello CE. A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in Fab-MS/MS Spectra of Glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* 1988;5(4):397-409.
67. Ko BJ, Brodbelt JS. 193 nm ultraviolet photodissociation of deprotonated sialylated oligosaccharides. *Anal Chem.* 2011;83(21):8192-200.
68. Holden DD, Brodbelt JS. Improving Performance Metrics of Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry by Selective Precursor Ejection. *Anal Chem.* 2017;89(1):837-46.
69. Wysocki VH, Resing KA, Zhang QF, Cheng GL. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods.* 2005;35(3):211-22.
70. Thompson MS, Cui WD, Reilly JP. Fragmentation of singly charged peptide ions by photodissociation at $\lambda=157$ nm. *Angewandte Chemie-International Edition.* 2004;43(36):4791-4.
71. Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, Watson JT. Novel Fragmentation Process of Peptides by Collision-Induced Decomposition in a Tandem Mass-Spectrometer - Differentiation of Leucine and Isoleucine. *Analytical Chemistry.* 1987;59(21):2621-5.
72. Fung YME, Kjeldsen F, Silivra OA, Chan TWD, Zubarev RA. Facile disulfide bond cleavage in gaseous peptide and protein cations by ultraviolet photodissociation at 157 nm. *Angewandte Chemie-International Edition.* 2005;44(39):6399-403.
73. Milosavljevic AR, Nicolas C, Gil JF, Canon F, Refregiers M, Nahon L, et al. VUV synchrotron radiation: a new activation technique for tandem mass spectrometry. *J Synchrotron Radiat.* 2012;19(Pt 2):174-8.
74. Vogel S, Rackwitz J, Schurman R, Prinz J, Milosavljevic AR, Refregiers M, et al. Using DNA origami nanostructures to determine absolute cross sections for UV photon-induced DNA strand breakage. *J Phys Chem Lett.* 2015;6(22):4589-93.
75. Devakumar A, Mechref Y, Kang P, Novotny MV, Reilly JP. Identification of isomeric N-glycan structures by mass spectrometry with 157 nm laser-induced photofragmentation. *J Am Soc Mass Spectr.* 2008;19(7):1027-40.
76. Thompson MS, Cui WD, Reilly JP. Factors that impact the vacuum ultraviolet photofragmentation of peptide ions. *J Am Soc Mass Spectr.* 2007;18(8):1439-52.
77. Kim TY, Reilly JP. Time-Resolved Observation of Product Ions Generated by 157 nm Photodissociation of Singly Protonated Phosphopeptides. *J Am Soc Mass Spectr.* 2009;20(12):2334-41.
78. Klein DR, Brodbelt JS. Structural Characterization of Phosphatidylcholines Using 193 nm Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry.* 2017;89(3):1516-22.

79. Klein DR, Holden DD, Brodbelt JS. Shotgun Analysis of Rough-Type Lipopolysaccharides Using Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2016;88(1):1044-51.
80. Ko BJ, Brodbelt JS. Comparison of glycopeptide fragmentation by collision induced dissociation and ultraviolet photodissociation. *Int J Mass Spectrom.* 2015;377:385-92.
81. Zhuang Z, Starkey JA, Mechref Y, Novotny MV, Jacobson SC. Electrophoretic analysis of N-glycans on microfluidic devices. *Analytical Chemistry.* 2007;79(18):7170-5.
82. Wojcik R, Zhu GJ, Zhang ZB, Yan XJ, Zhao YM, Sun LL, et al. Capillary zone electrophoresis as a tool for bottom-up protein analysis. *Bioanalysis.* 2016;8(2):89-92.
83. Peng J, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ, Gygi SP. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J Proteome Res.* 2003;2(1):43-50.
84. McDonald WH, Ohi R, Miyamoto DT, Mitchison TJ, Yates JR. Comparison of three directly coupled HPLC MS/MS strategies for identification of proteins from complex mixtures: single-dimension LC-MS/MS, 2-phase MudPIT, and 3-phase MudPIT. *Int J Mass Spectrom.* 2002;219(1):245-51.
85. Tamaoka J, Komagata K. Determination of DNA-Base Composition by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. *Fems Microbiol Lett.* 1984;25(1):125-8.
86. Ickert S, Hofmann J, Riedel J, Beck S, Pagel K, Linscheid MW. Charge-induced geometrical reorganization of DNA oligonucleotides studied by tandem mass spectrometry and ion mobility. *Eur J Mass Spectrom (Chichester).* 2018;24(2):225-30.
87. Revercomb HE, Mason EA. Theory of Plasma Chromatography Gaseous Electrophoresis - Review. *Analytical Chemistry.* 1975;47(7):970-83.
88. Kanu AB, Dwivedi P, Tam M, Matz L, Hill HH, Jr. Ion mobility-mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2008;43(1):1-22.
89. Bohrer BC, Mererbloom SI, Koeniger SL, Hilderbrand AE, Clemmer DE. Biomolecule Analysis by Ion Mobility Spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry.* 2008;1:293-327.
90. Lanucara F, Holman SW, Gray CJ, Evers CE. The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics. *Nat Chem.* 2014;6(4):281-94.
91. Uetrecht C, Rose RJ, van Duijn E, Lorenzen K, Heck AJR. Ion mobility mass spectrometry of proteins and protein assemblies. *Chem Soc Rev.* 2010;39(5):1633-55.
92. Gray CJ, Thomas B, Upton R, Migas LG, Evers CE, Barran PE, et al. Applications of ion mobility mass spectrometry for high throughput, high resolution glycan analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860(8):1688-709.
93. Hofmann J. Ion Mobility-Mass Spectrometry of Complex Carbohydrates. Dissertation. 2017.
94. E. A. Mason EWM, Transport Properties of Ions in Gases, WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1988.
95. Von Helden G, Kemper PR, Gotts NG, Bowers MT. Isomers of Small Carbon Cluster Anions - Linear-Chains with up to 20 Atoms. *Science.* 1993;259(5099):1300-2.
96. Allen SJ, Giles K, Gilbert T, Bush MF. Ion mobility mass spectrometry of peptide, protein, and protein complex ions using a radio-frequency confining drift cell. *Analyst.* 2016;141(3):884-91.
97. Ewing RG, Atkinson DA, Eiceman GA, Ewing GJ. A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds. *Talanta.* 2001;54(3):515-29.

98. von Helden G. Homochiral serine octamer anions: Infrared spectrum and structure of the chloride adduct. *Abstr Pap Am Chem S.* 2017;254.
99. Seo J, Warnke S, Pagel K, Bowers MT, von Helden G. Infrared spectrum and structure of the homochiral serine octamer-dichloride complex. *Nat Chem.* 2017;9(12):1263-8.
100. Seo J, Hoffmann W, Warnke S, Bowers MT, Pagel K, von Helden G. Retention of Native Protein Structures in the Absence of Solvent: A Coupled Ion Mobility and Spectroscopic Study. *Angewandte Chemie-International Edition.* 2016;55(45):14173-6.
101. Hofmann J, Hahm HS, Seeberger PH, Pagel K. Identification of carbohydrate anomers using ion mobility-mass spectrometry. *Nature.* 2015;526(7572):241-+.
102. Hofmann J, Pagel K. Glycan Analysis by Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition.* 2017;56(29):8342-9.
103. Pulfer M, Murphy RC. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev.* 2003;22(5):332-64.
104. Kailemia MJ, Ruhaak LR, Lebrilla CB, Amster IJ. Oligosaccharide Analysis by Mass Spectrometry: A Review of Recent Developments. *Analytical Chemistry.* 2014;86(1):196-212.
105. Arnott D, Shabanowitz J, Hunt DF. Mass-Spectrometry of Proteins and Peptides - Sensitive and Accurate Mass Measurement and Sequence-Analysis. *Clin Chem.* 1993;39(9):2005-10.
106. Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics.* 2011;74(10):1842-51.
107. Tost J, Gut IG. DNA analysis by mass spectrometry-past, present and future. *J Mass Spectrom.* 2006;41(8):981-95.
108. Harkewicz R, Dennis EA. Applications of Mass Spectrometry to Lipids and Membranes. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:301-25.
109. McLuckey SA, Van Berkel GJ, Glish GL. Tandem mass spectrometry of small, multiply charged oligonucleotides. *J Am Soc Mass Spectrom.* 1992;3(1):60-70.
110. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass-Spectra of Peptides. *Biomedical Mass Spectrometry.* 1984;11(11):601-.
111. Bartlett MG, McCloskey JA, Manalili S, Griffey RH. The effect of backbone charge on the collision-induced dissociation of oligonucleotides. *Journal of Mass Spectrometry.* 1996;31(11):1277-83.
112. Edwards JR, Ruparel H, Ju JY. Mass-spectrometry DNA sequencing. *Mutat Res-Fund Mol M.* 2005;573(1-2):3-12.
113. Pan S, Verhoeven K, Lee JK. Investigation of the initial fragmentation of oligodeoxynucleotides in a quadrupole ion trap: Charge level-related base loss. *J Am Soc Mass Spectr.* 2005;16(11):1853-65.
114. Favre A, Gonnet F, Tabet JC. Location of the negative charge(s) on the backbone of single-stranded deoxyribonucleic acid in the gas phase. *Eur J Mass Spectrom.* 2000;6(5):389-96.
115. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953;171(4356):737-8.
116. Bayer E, Bauer T, Schmeer K, Bleicher K, Maier M, Gaus HJ. Analysis of double-stranded oligonucleotides by electrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 1994;66(22):3858-63.
117. Wan KX, Gross ML, Shibue T. Gas-phase stability of double-stranded oligodeoxynucleotides and their noncovalent complexes with DNA-binding drugs as revealed by collisional activation in an ion trap. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2000;11(5):450-7.

118. Hofstadler SA, Griffey RH. Analysis of noncovalent complexes of DNA and RNA by mass spectrometry. *Chem Rev.* 2001;101(2):377-90.
119. Gabelica V, De Pauw E, Rosu F. Interaction between antitumor drugs and a double-stranded oligonucleotide studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 1999;34(12):1328-37.
120. Ganem B, Li YT, Henion JD. Detection of Oligonucleotide Duplex Forms by Ion-Spray Mass-Spectrometry. *Tetrahedron Lett.* 1993;34(9):1445-8.
121. Gabelica V, De Pauw E. Comparison of the collision-induced dissociation of duplex DNA at different collision regimes: Evidence for a multistep dissociation mechanism. *J Am Soc Mass Spectr.* 2002;13(1):91-8.
122. S. Ickert JH, J. Riedel, S. Beck, K. Pagel, M.W. Linscheid. From Solution to Isolation: Non covalent Interactions Stabilize Compact Structures of DNA Oligomers in the Gas Phase. *Eur J Mass Spectrom.* 2018;24(2):225.
123. Frieden M, Christensen SM, Mikkelsen ND, Rosenbohm C, Thruue CA, Westergaard M, et al. Expanding the design horizon of antisense oligonucleotides with alpha-L-LNA. *Nucleic Acids Research.* 2003;31(21):6365-72.
124. Elmen J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu YH, et al. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Research.* 2005;33(1):439-47.
125. Bramsen JB, Laursen MB, Damgaard CK, Lena SW, Babu BR, Wengel J, et al. Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs. *Nucleic Acids Research.* 2007;35(17):5886-97.
126. Wengel J, Petersen M, Frieden M, Koch T. Chemistry of locked nucleic acids (LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties. *Lett Pept Sci.* 2003;10(3-4):237-53.
127. Frieden M, Hansen HF, Koch T. Nuclease stability of LNA oligonucleotides and LNA-DNA chimeras. *Nucleos Nucleot Nucl.* 2003;22(5-8):1041-3.
128. Wood MJA, Talbot K, Bowerman M. Spinal muscular atrophy: antisense oligonucleotide therapy opens the door to an integrated therapeutic landscape. *Hum Mol Genet.* 2017;26(R2):R151-R9.
129. Skotte NH, Southwell AL, Ostergaard ME, Carroll JB, Warby SC, Doty CN, et al. Allele-specific suppression of mutant huntingtin using antisense oligonucleotides: providing a therapeutic option for all Huntington disease patients. *Plos One.* 2014;9(9):e107434.
130. Obika S, Nanbu D, Hari Y, Morio K, In Y, Ishida T, et al. Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C-3,-endo sugar puckering. *Tetrahedron Lett.* 1997;38(50):8735-8.
131. Koshkin AA, Singh SK, Nielsen P, Rajwanshi VK, Kumar R, Meldgaard M, et al. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron.* 1998;54(14):3607-30.
132. Huang TY, Kharlamova A, McLuckey SA. Ion Trap Collision-Induced Dissociation of Locked Nucleic Acids. *J Am Soc Mass Spectr.* 2010;21(1):144-53.
133. Petersen M, Wengel J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.* 2003;21(2):74-81.
134. McLuckey SA, Vanberkel GJ, Goeringer DE, Glish GL. Ion-Trap Mass-Spectrometry - Using High-Pressure Ionization. *Analytical Chemistry.* 1994;66(14):A737-A43.
135. Rosu F, Gabelica V, Joly L, Gregoireb G, De Pauw E. Zwitterionic i-motif structures are preserved in DNA negatively charged ions produced by electrospray mass spectrometry. *Phys Chem Chem Phys.* 2010;12(41):13448-54.

136. Arcella A, Dreyer J, Ippoliti E, Ivani I, Portella G, Gabelica V, et al. Structure and dynamics of oligonucleotides in the gas phase. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015;54(2):467-71.
138. Morsa D, Gabelica V, Rosu F, Oomens J, De Pauw E. Dissociation Pathways of Benzylpyridinium "Thermometer" Ions Depend on the Activation Regime: An IRMPD Spectroscopy Study. *J Phys Chem Lett*. 2014;5(21):3787-91.
139. Larriba-Andaluz C, Hogan CJ, Jr. Collision cross section calculations for polyatomic ions considering rotating diatomic/linear gas molecules. *J Chem Phys*. 2014;141(19):194107.
140. Siems WF, Viehland LA, Hill HH, Jr. Improved momentum-transfer theory for ion mobility. 1. Derivation of the fundamental equation. *Anal Chem*. 2012;84(22):9782-91.
141. Jedrychowski MP, Huttlin EL, Haas W, Sowa ME, Rad R, Gygi SP. Evaluation of HCD- and CID-type fragmentation within their respective detection platforms for murine phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(12):M111 009910.
142. Michalski A, Damoc E, Hauschild JP, Lange O, Wiegand A, Makarov A, et al. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(9):M111 011015.
143. Frese CK, Altelaar AF, Hennrich ML, Nolting D, Zeller M, Griep-Raming J, et al. Improved peptide identification by targeted fragmentation using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J Proteome Res*. 2011;10(5):2377-88.
144. McAlister GC, Phanstiel D, Wenger CD, Lee MV, Coon JJ. Analysis of tandem mass spectra by FTMS for improved large-scale proteomics with superior protein quantification. *Anal Chem*. 2010;82(1):316-22.
145. V.Gabelica DP. Collision-induced dissociation of 16-mer DNA duplexes with various sequences: evidence for conservation of the double helix conformation in the gas phase. *Int J Mass Spectrom*. 2002;219(1):151-9.
146. McLuckey SA, Habibi-Goudarzi S. Ion trap tandem mass spectrometry applied to small multiply charged oligonucleotides with a modified base. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1994;5(8):740-7.
147. Hamamatsu. High Brightness VUV light source unit-L10366 Series. Manual.
148. Allen SJ, Giles K, Gilbert T, Bush MF. Ion mobility mass spectrometry of peptide, protein, and protein complex ions using a radio-frequency confining drift cell. *Analyst*. 2016;141(3):884-91.
149. <https://www.crystran.co.uk/optical-materials/magnesium-fluoride-mgf2> (letzter Zugriff 13.3.2018)